

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



DOTTORATO DI RICERCA

IN

BIOLOGIA AVANZATA

XXVII CICLO

“Citotossicità del cadmio sullo sviluppo embrionale e sull’encefalo
dell’adulto in *Danio rerio*”

“Cadmium cytotoxicity on embryonic development and on brain of
adult in *Danio rerio*”

Tutor

Ch.ma Prof.ssa

Grimaldi Maria Consiglio

Cotutor

Ch.ma Prof.ssa

Ida Ferrandino

Coordinatore

Ch.mo Prof.

Luciano Gaudio

Candidato

Dott.

Antonio Monaco

Anno Accademico 2013/2014

Sommario

Numerose evidenze dimostrano che il progressivo inquinamento ambientale ed alimentare che accompagna e caratterizza la società industrializzata mette in crisi il nostro sistema detossificante, producendo un incremento di malattie neurodegenerative. A causa del grande numero di persone che sono esposte a questi contaminanti l'influenza dei contribuenti ambientali allo sviluppo della malattie neurodegenerative acquisisce sempre maggiore attenzione. I metalli tossici sono sicuramente tra i principali responsabili. Il cadmio (Cd) è considerato uno dei metalli pesanti più pericolosi per la salute, teratogeno e cancerogeno, viene largamente impiegato in molteplici lavorazioni. La sua emivita biologica estremamente lunga (30 anni) è la principale causa dell'accumulo irreversibile di questo metallo negli organi degli animali e dell'uomo. Per caratterizzare la citotossicità esercitata dal Cd nell'encefalo di un vertebrato, con la finalità di verificare l'innescò di processi tipici di malattie neurodegenerative, ho scelto come modello il pesce teleosteo *Danio rerio*, esponendo sia adulti che embrioni ad una soluzione di cloruro di cadmio (CdCl_2) avente concentrazione di 1mg/L, tipica di ambienti massivamente contaminati dall'attività industriale. Questa stessa concentrazione inoltre ha portato ad accumulo nell'encefalo di individui adulti di *Danio rerio* in modo progressivo, in esperimenti durati 16 giorni, in precedenza effettuati nel laboratorio della Prof.ssa Ferrandino. I risultati ottenuti in questo lavoro attestano la presenza, nell'encefalo dei pesci adulti esposti al Cd, di alterazioni istomorfologiche consistenti in edemi e dilatazioni tissutali con alterazione della componente mielinica. Proprio per quanto riguarda la mielina gli esperimenti effettuati hanno mostrato l'incremento dell'mRNA del gene myelin protein zero (mpz), caratteristica osservata in caso di danno al sistema nervoso in *Danio rerio*. L'analisi dell'espressione genica ha mostrato un'alterazione a carico della componente astrogliale consistente in una riduzione dell'espressione della proteina GFAP, fondamentale per il corretto funzionamento delle cellule della astroglia, e di

conseguenza anche dei neuroni. Proprio a carico dei neuroni, soprattutto a livello delle popolazioni cellulari del pallio, del subpallio e per le cellule cerebellari del Purkinje, sono state riscontrate alterazioni consistenti in incremento dei livelli di accumulo del peptide β -amiloide, quello fibrillogenico costituito da 42 residui amminoacidici, principale protagonista dello sviluppo della patologia di Alzheimer. In accordo con questo dato è stato riscontrato un incremento dell'interleuchina 1- β dopo 2 giorni, con conseguente ritorno ai livelli normali dopo 16 giorni di esposizione. Un'altra caratteristica spesso associata a patologie neurodegenerative, oltre all'infiammazione, è la disfunzione sinaptica e l'iper-eccitazione, correlate con variazioni dell'espressione della glutammato deidrogenasi. Mediante western blotting sugli estratti proteici totali di pesci esposti a CdCl_2 ho riscontrato un incremento dei livelli di tale enzima negli encefali. Attraverso l'approccio immunoistochimico ho osservato un aumento dell'intensità del segnale sia a livello di cellule nervose GABAergiche che glutamatergiche, a livello delle cellule del Purkinje del cervelletto, del diencefalo e del telencefalo, soprattutto ventrale. E' stato inoltre interessante osservare un decremento dell'espressione del fattore neurotrofico BDNF già dopo due giorni di esposizione, soprattutto in virtù di quanto osservato con la GFAP, a causa delle connessioni con la neurogenesi dell'adulto di entrambi i polipeptidi. Questo studio conferma inoltre la capacità del cadmio di arrecare danni ai meccanismi di sviluppo e in particolar modo del sistema nervoso centrale, determinando letalità, alterazioni fenotipiche ed aumento dei fenomeni apoptotici negli embrioni trattati. I risultati ottenuti quindi confermano gli effetti tossici esercitati dal Cd sull'encefalo di questo pesce, sia sulla componente neuronale che gliale, come riportato da altri lavori effettuati in precedenza su organismi modello differenti, mostrando anche gli effetti esercitati da questo sullo sviluppo embrionale.

INDICE

<u>Capitolo 1: Il Cadmio</u>	<u>pag.7</u>
1.1 Caratteristiche generali del cadmio	pag.8
1.2 Impiego del cadmio	pag.9
1.3 Esposizione	pag.10
1.4 Effetti del cadmio sulla salute dell'uomo	pag.11
1.5 Assorbimento del cadmio nel SNC e distribuzione	pag.14
1.6 Effetti del cadmio sul SNC	pag.16
1.7 Il cadmio nelle patologie del SNC	pag.17
<u>Capitolo 2: <i>Danio Rerio</i> come modello</u>	<u>pag.19</u>
2.1 Origine e distribuzione	pag.20
2.2 Caratteristiche anatomiche e comportamento	pag.22
2.3 Ciclo e comportamento riproduttivo	pag.23
2.4 Sviluppo embrionale di <i>Danio rerio</i>	pag.25
2.4.1 Principali fasi dello sviluppo	pag.29
2.5 <i>Danio rerio</i> come organismo modello	pag.34
2.5.1 Modello per le malattie neurodegenerative	pag.36
<u>Capitolo 3: Il sistema nervoso di <i>Danio rerio</i></u>	<u>pag.40</u>
3.1 L'encefalo di <i>Danio rerio</i>	pag.41
3.2 Citologia del Sistema nervoso	pag.50
3.2.1 Cellule dell'astroglia	pag.51
3.2.2 Componente mielinica	pag.53
3.3 Signalling neurotrofico e la famiglia delle neurotrofine	pag.57

Capitolo 4 : Scopo della Ricerca **pag.60**

Capitolo 5: Materiali e metodi **pag.62**

5.1 Stabulazione dei pesci	pag.63
5.2 Raccolta delle uova	pag.63
5.2.1 Allevamento embrioni	pag.64
5.2.2 Test di tossicità in vivo	pag.64
5.2.3 Selezione delle uova	pag.64
5.2.4 Trattamento di embrioni con CdCl ₂	pag.65
5.2.5 Osservazione in vivo	pag.65
5.2.6 Colorazione con arancio di acridina	pag.65
5.3 Trattamento acuto in vivo su individui adulti con CdCl ₂	pag.66
5.4 Allestimento preparati per la microscopia ottica	pag.67
5.5 Colorazione Ematossilina-Eosina	pag.67
5.6 Colorazione con Cresyl Violetto	pag.68
5.7 Colorazione istochimica con Fluorojade C	pag.69
5.8 Colorazione con Methasol Fast Blue	pag.69
5.9 Analisi immunoistochimica con metodo ABC	pag.71
5.10 Saggio di permeabilità della BEE alla perossidasi	pag.72
5.11 Analisi biochimica	pag.73
5.11.1 Quantificazione delle proteine: saggio Pierce	pag.74
5.11.2 Analisi delle proteine mediante Western Blotting	pag.74
5.12 Analisi dei livelli di accumulo degli mRNA	pag.79
5.12.1 Estrazione dell'RNA totale	pag.79
5.12.2 Quantificazione dell'RNA	pag.81
5.12.3 Verifica dell'integrità dell'RNA	pag.82
5.12.4 Retrotrascrizione	pag.84

5.12.5 PCR semiquantitativa	pag.85
5.12.6 Elettroforesi su gel di agarosio	pag.88
5.13 Realizzazione delle immagini	pag.88
5.14 Analisi statistica	pag.88

Capitolo 6: Risultati **pag.89**

6.1 Mortalità ed alterazioni fenotipiche degli embrioni	pag.90
6.2 Valutazione dell'apoptosi nell'encefalo degli embrioni	pag.93
6.3 Analisi della tossicità del cadmio su adulti	pag.94
6.3.1 Osservazioni visive su Danio rerio	pag.94
6.3.2 Indagini istomorfologiche	pag.94
6.3.3 Analisi dell'integrità della mielina	pag.97
6.3.4 Analisi della fluorescenza con Fluor Jade C	pag.103
6.4 Analisi dell'espressione genica	pag.104
6.4.1 Variazione del marker GFAP	pag.104
6.4.2 Variazione del marker peptide β -amiloide ₁₋₄₂	pag.109
6.4.3 Variazione del marker GLUD1	pag.115
6.4.4 Variazione del marker interleuchina 1- β	pag.120
6.4.5 Variazione delle neurotrofine BDNF, NGF	pag.121
6.5 Analisi della integrità della BEE	pag.125
6.6 Analisi degli mRNA dei geni plp1, mpz, mbp	pag.126

Capitolo 7: Discussione e Conclusioni **pag.128**

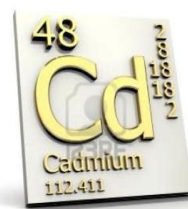
Bibliografia	pag.133
--------------	---------

Capitolo 1

Il Cadmio

1.1 Caratteristiche generali del cadmio

Scoperto nel 1817 in Germania da Friedrich Strohmeyer, il cadmio è un metallo bivalente dall'aspetto argenteo con riflessi azzurrognoli; è malleabile, duttile e tenero al punto che può essere tagliato con un normale coltello. Il suo numero atomico è 48 ed il suo simbolo è Cd. Nei suoi composti ha numero di ossidazione +2. Sono noti alcuni rari casi in cui ha numero di ossidazione +1. E' solubile in acidi ma non in alcali; per molti aspetti è simile allo zinco ma si presta a composti più complessi. Il cadmio è distribuito uniformemente lungo la crosta terrestre ed essendo un elemento volatile può essere trasportato a grandi distanze dagli agenti atmosferici. Rari sono i giacimenti di minerali nei quali può essere rinvenuto come componente principale (ad esempio la greenockite o CdS).



gruppo

Tavola periodica degli elementi

gas nobili VIII

periodo

elementi di transizione

lantanidi

attinidi

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	H	He															He
2	Li	Be															Ne
3	Na	Mg															Ar
4	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br
5	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I
6	Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At
7	Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Uub	Uut	Uuq	Uup	Uuh	Uus

Collocazione del cadmio nella tavola periodica degli elementi

1.2 Impiego del Cadmio

A differenza di altri metalli, l'utilizzo del cadmio è iniziato abbastanza di recente, con la sua applicazione in larga scala a partire dal 1940. Oggi circa i tre quarti della quantità di cadmio prodotta viene usata nelle pile al nichel-cadmio, la parte minore è utilizzata per produrre pigmenti, rivestimenti e stabilizzanti per materie plastiche (Waisberg et al., 2003). Tra gli altri usi si annoverano: l'impiego in leghe



metalliche basso fondenti e per saldatura, l'impiego in leghe metalliche ad alta resistenza all'usura, l'impiego nelle cadmiature, ovvero nel rivestimento di materiali



con un film di cadmio metallico tramite elettrodeposizione, come barriera per controllare le reazioni di fissione nucleare, inoltre alcuni composti del cadmio sono degli stabilizzanti per il PVC. I sali di cadmio trovano impiego in campo fotografico e

nella fabbricazione di fuochi artificiali, gomme, vernici fluorescenti, vetri, porcellane e ceramiche. Il solfuro di cadmio (CdS), un composto giallo chiaro che si ottiene come precipitato da soluzioni di sali di cadmio, è usato come pigmento e trova applicazione anche nella realizzazione di celle fotovoltaiche.

1.3 Esposizione

Le fonti di contaminazione di metalli pesanti hanno due origini: naturale ed antropica. La fonte naturale è rappresentata dal substrato geologico stesso mentre, tra le sorgenti di origine antropica le più rilevanti sono dovute alle attività civili, industriali e alle pratiche agricole (Casalicchio, 2000). Tra le pratiche agricole di particolare interesse e rilevanza è il riutilizzo nell'agricoltura di fanghi e compost ricchi in sostanze organiche e minerali, prodotti dalla depurazione delle acque di scarico urbane (reflue), la cui principale limitazione d'uso dipende dai loro contenuti in metalli pesanti. Fra le fonti di contaminazione ambientale Stoeppler (1991) ricorda come il cadmio sia altresì presente nei fertilizzanti, nelle acque di scarico e nei fanghi di origine urbana. Sebbene il Cd risulti alquanto idrosolubile, la presenza di ioni solfuro in grado di precipitare il metallo come CdS fa sì che l'uomo, in genere, assuma solo una piccola percentuale del cadmio direttamente dall'acqua potabile o dall'aria. Fanno eccezione gli individui che vivono in prossimità di miniere e di fonderie, in modo particolare quelle che producono zinco. Esistono aree isolate in cui la concentrazione di cadmio presente



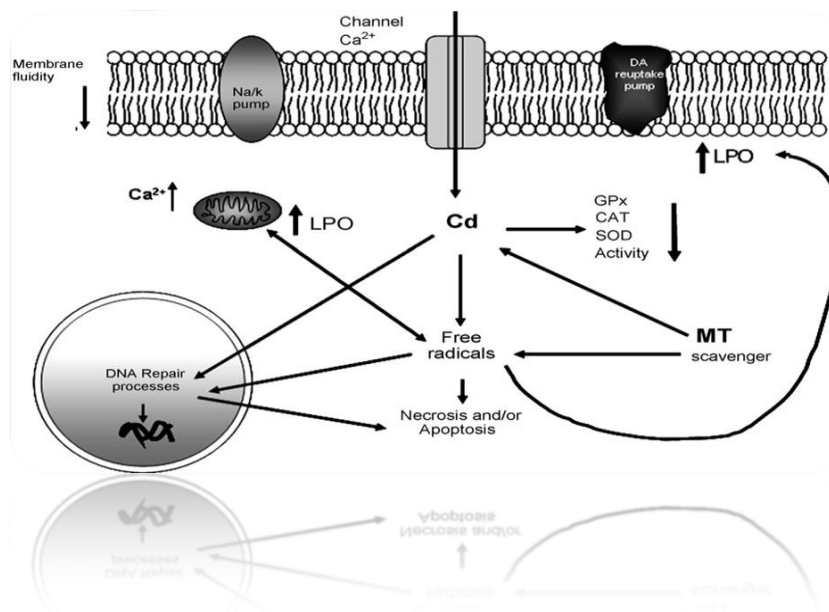
nell'acqua potabile è talmente elevata che la comune assunzione giornaliera risulta raddoppiata. Anche i fumatori risultano esposti al cadmio, assorbito da parte delle foglie di tabacco, dal suolo e dall'acqua. Si pensi al tal proposito che un pacchetto di sigarette può portare all'inalazione di circa 2-4 μg di Cd. Quasi tutti gli alimenti contengono

cadmio in misura variabile per effetto della contaminazione ambientale. I frutti di mare (molluschi) e gli organi interni, in particolare i reni, possiedono le concentrazioni più elevate rispetto agli altri alimenti. Occorre precisare che la maggior quantità di metallo presente nell'alimentazione deriva in genere dalle patate, dal grano, dal riso e altri cereali.

1.4 Effetti del cadmio sulla salute dell'uomo

Il cadmio non riveste alcun ruolo biologico nel corpo umano. Sia esso che i suoi composti sono tossici a basse concentrazioni e tendono ad accumularsi negli organismi e negli ecosistemi, non a caso il cadmio tende a biomagnificare lungo la catena alimentare (Bullini et al., 2002). Le principali vie di assorbimento per l'uomo e gli animali sono rappresentate da quella inalatoria e gastroenterica; la prima riveste particolare importanza soprattutto per l'uomo, che può risultare esposto al cadmio per motivi occupazionali (dal 10 al 40% della quantità inalata viene assorbita dal polmone). L'entità nel tratto gastroenterico è influenzata non solo dalla solubilità del sale ma anche dai livelli di zinco presenti nell'organismo (l'intestino assorbe dallo 0.5% ad un massimo del 12% della quantità ingerita) (Johnson and Sigman 1971; Nordberg et al., 1985). Il Cd in circolazione nel corpo è prevalentemente intraeritrocitario (90-95%), fissato all'emoglobina e alla metallotioneina (MT), nel sangue esso ha un'emivita di oltre 2 ore; nel rene e nel fegato si deposita in notevole quantità, circa l'80% (almeno 1/3 di quella presente normalmente nell'organismo)

permanendovi per 15-20 anni (Waalkes, 2003). E' scarsamente eliminato con urine e feci e la sua emivita globale nell'organismo è di 10-30 anni, con conseguente aumento della concentrazione nei tessuti per tutta la vita. L'assorbimento per via cutanea è praticamente trascurabile. Non passa la barriera placentare, ma può bloccare e ridurre il passaggio di zinco e rame, essenziali per lo sviluppo del feto. L'assunzione degli oligoelementi metallici da parte degli organismi è mediata dall'alimentazione: lo zinco e il rame, per esempio, sono assorbiti attraverso l'apparato gastrointestinale, messi in circolo sottoforma di complessi proteici con l'albumina e rapidamente distribuiti agli organi (Cousins, 1985). Il cadmio si lega ai residui cisteinici delle proteine e, con alta affinità, anche ai domini Zinc-binding di molte metalloproteine, interferendo, o addirittura bloccando, le funzioni cellulari Zn-dipendenti. Il Cd, inoltre, causa perossidazione dei lipidi e, nel nucleo, rotture nel DNA con inibizione dei meccanismi di riparo (Hassoun and Stohs, 1996). Molti di questi effetti sono legati alla produzione di specie ossigeno reattive (ROS) e/o all'abbassamento dei livelli di glutathione (Stohs e Bagchi, 1995) e degli enzimi antiossidanti (Casalino et al., 2002).



Effetti tossici documentati del cadmio all'interno delle cellule (Armenta and Rios, 2007)

Inoltre induce inibizione del rilascio di neurotrasmettitori (acetilcolina, MAO), inibizione del riassorbimento a livello sinaptico di colina, GABA (acido γ -aminobutirrico), acido glutammico e catecolamine, necrosi delle cellule nervose, osteoporosi, osteomalacia, ipertensione arteriosa, arteriosclerosi, impotenza, necrosi tubulare renale, iperattività e disturbi dell'apprendimento, alopecia, anemia, malattie cardiovascolari, fertilità. Il fegato e i reni sono le zone in cui si depositano cadmio e zinco; il cadmio poi si stabilisce nelle arterie, aumentando la pressione arteriosa e causando arteriosclerosi. Il cadmio può aumentare lo spessore della membrana basale dei piccoli vasi e dei capillari riducendo la circolazione. Nelle donne viene interessata anche la circolazione uterina con conseguente possibile prematurità o deformità del feto. I suoi composti sono irritanti: gli effetti acuti comprendono irritazioni alla cute, mucosa nasale e bronchiale, edema polmonare; gli effetti tossici cronici sono a carico del rene (Robbins, 1999). La tossicità del Cd nell'organismo viene tenuta sotto

controllo dallo zinco, ed un'interferenza con il metabolismo di quest'ultimo potrebbe favorire l'azione tossica del cadmio. La presenza dello zinco sembra stimoli in ambito epatico la sintesi di MT capaci di bloccare cadmio bivalente, mentre un basso tenore alimentare di rame può diminuire la tolleranza al cadmio. Le Metallotioneine (MT), rappresentano una famiglia di proteine a basso peso molecolare (6-8 KDa) altamente conservate; presentano dai 61-68 amminoacidi e sono ricche di residui cisteinici, hanno una buona capacità di formare complessi con i metalli pesanti. L'espressione delle MT è indotta in seguito all'esposizione dell'organismo ad elevate concentrazioni di metalli pesanti e questa risposta costituisce una difesa rapida ed efficiente da parte degli organismi viventi all'esposizione indesiderata ai metalli tossici come il cadmio (Mehus et al., 2014). Il Cd induce la sintesi epatica e renale di metallotioneina, e se questo meccanismo di difesa è sopraffatto il cadmio danneggia i tubuli contorti prossimali, causando proteinuria (Robbins, 1999).

1.5 Assorbimento del cadmio nel SNC e distribuzione

Il sistema nervoso centrale è particolarmente vulnerabile durante lo sviluppo neonatale; il cadmio è capace di arrivare velocemente al feto per via placentale ed è stato rilevato nel latte durante l'allattamento (Korpela et al., 1986). Il Cd può essere assimilato mediante la mucosa nasale o il pathway olfattivo nel SNC; quindi, il SNC è soggetto alla tossicità del Cd (Lafuente and Esquifino, 1999; Esquifino et al., 1999;

Lafuente et al., 1999). In condizioni fisiologiche il Cd raggiunge in quantità molto scarse il cervello di individui adulti a causa della presenza della barriera emato-encefalica (BEE); tuttavia, questa barriera risulta non completamente sviluppata in animali giovani (Pal et al., 1993). Il Cd tende ad accumularsi nel plesso corioideo in concentrazioni molto maggiori di quelle trovate nel liquido fluido cerebrospinale e in qualunque altra parte del tessuto cerebrale. Uno studio umano post-mortem rivela che la concentrazione del cadmio nel plesso corioideo era 2-3 volte maggiore di quella osservata nella corteccia cerebrale (Manton and Cook, 1984). Come un agente tossico generale del plesso corioideo il Cd può direttamente danneggiare l'ultrastruttura del plesso. A causa di differenze nell'integrità della BEE (Antonio et al., 2003), il Cd risulta essere maggiormente tossico per ratti neonati e giovani rispetto quelli adulti. Il Cd può incrementare la permeabilità della BEE (Shukla and Chandra, 1987) penetrare ed accumularsi nel cervello di ratti in via di sviluppo e adulti (Goncalves et al., 2010; Mendez-Armenta, 2007), portando ad accumulo intracellulare nel cervello, disfunzione cellulare, edema cerebrale. Gabbiani et al., (1967), Nolan and Shaikh (1996) hanno dimostrato che la somministrazione di Cd inizialmente influisce sull'integrità e la permeabilità dell'endotelio vascolare e che i cambiamenti necrotici a carico delle cellule nervose sono solo secondari a questo effetto, portando ad edema e interferenza con l'uptake dei nutrienti e dell'ossigeno nel cervello, soprattutto nei ratti in via di sviluppo. Il Cd è trasportato lungo i neuroni olfattivi primari alle loro terminazioni nei bulbi olfattivi, bypassando la BEE. Il percorso olfattivo potrebbe quindi essere una probabile via per raggiungere il cervello e dovrebbe essere presa in

considerazione nella valutazione occupazionale del rischio per questo metallo (Tjalve et al., 1996; Bondier et al., 2008; Czarnecki et al., 2011).

1.6 Gli effetti del cadmio sul SNC

Studi sperimentali condotti sul SNC di ratti e conigli neonati esposti ad alte dosi di Cd hanno mostrato estensive emorragie nelle cortecce cerebrali e cerebellari, diverse cellule piramidali con nuclei picnotici, cellule neuro gliali con citolisi e cellule del Purkinje alterate (Gabbiani et al., 1967). Wong and Klaassen (1982) osservarono danni a carico del SNC in ratti neonati in seguito ad esposizione a basse dosi di Cd; corteccia cerebrale, cervelletto, nucleo caudato e putamen mostravano necrosi ed emorragia. Nelle aree necrotiche della corteccia cerebrale e del cervelletto, l'endotelio di alcuni vasi sanguigni era leggermente danneggiato. Tutte queste alterazioni erano in accordo con le osservazione di Mendez-Armenta et al., 2001, che hanno riportato danno a carico della corteccia cerebrale e del cervelletto (picnosi, edema e alterazione delle cellule del Purkinje). Da i risultati presenti in letteratura sembrerebbe che la somministrazione di Cd inizialmente altera l'integrità e la permeabilità dell'endotelio vascolare e le alterazioni necrotiche nelle cellule nervose insorgono secondariamente a questo effetto (Yoshida, 2001). L'ultrastruttura del nervo ottico di ratti esposti al Cd è caratterizzata da mitocondri gonfi con le creste distrutte. Queste alterazioni sono

evidenza di che la distruzione dei mitocondri è la causa principale del deficit funzionale generato nella materia bianca dal Cd, mentre, le alterazioni a carico dei microtubuli potrebbero essere un fattore secondario (Fern et al., 1996).

Year	Study design	Age group	E/C (n)	Exposure to Cd	Exposure pathways	Effects	Reference
1961	Cross-sectional	Male worker	106E/84C	—	Occupational exposure	Anosmia	[63]
1977	Cross-sectional	Children	31E/22C	CdH	Daily life	Neurological disorders, such as learning disabilities and hyperactivity	[11]
1981	Cross-sectional	Children	73E/44C	CdH	Daily life	Dyslexic, learning disorder	[15]
1981	Cross-sectional	Workers	49E	CdU	Occupational exposure	Polyneuropathy	[64]
1982	Cross-sectional	Children	149	CdH	Daily life	Effect on verbal I.Q.	[16]
1985	Case-control	Young men	40	CdH	Daily life	Behavioural difficulty	[65]
1985	Cross-sectional	Children	69	CdH	Daily life	Nonadaptive classroom behavior, affected behavioral development visuomotor skills ↓	[18]
1989	Cross-sectional	Male workers	31E	CdU	Occupational exposure	↓ Attention, memory, and psychomotor speed	[66]
1992	Cross-sectional	Worker	38E	CdU	Occupational exposure	90% Headache; 42% dizzy spells 21% weakness; 16% brain atrophy	[67]
1992	Cross-sectional	Worker	55E/16C	CdU	Occupational exposure	Hyposmia	[68]
1997	Case report	Old man	1	Multiple organ failure	Occupational exposure, acute	Parkinsonism	[50]
1999	Cross-sectional	Worker	13E/19C	CdU	Occupational exposure	Polyneuropathy	[37]
2000	Cross-sectional	Adult worker	42E/47C	CdU	Occupational exposure	↓ Motor speed, attention, memory ↑ equilibrium, PNP, and concentration complaints	[69]
2006	Case report	Adult workers	1	CdU	Inhale the fumes	Peripheral neuropathy	[70]
2009	Cross-sectional	Children	549	CdH	Daily life	Withdrawal, social problems and attention problems associated	[71]
2012	Wistar rats	Male	20E/20C	Intratracheal instillation	Experiment exposure	Dose- and time-dependent shift from slower to faster waves	[72]

E: exposed subjects, C: control subjects; CdU: urinary cadmium concentration; CdH: concentration of cadmium in hair; I.Q.: Intelligence Quotient.

Documentazione della neurotossicità del cadmio in uomo e ratti (Wang and Du, 2013)

1.7 Il Cadmio nelle neuropatologie

Solo recentemente il cadmio è stato riconosciuto come neurotossina in quanto danneggia il sistema nervoso. Nell'uomo, in particolare, l'esposizione occupazionale al Cd è associata a disordini neuronali (Hart et al., 1989). Il cadmio produce neurotossicità causando complesse patologie che includono disfunzioni neurologiche in adulti e bambini (Shukla and Singhal, 1984; Hart et al., 1989), alterazioni neurochimiche del SNC (Gupta et al., 1993-1995; Gutierrez-Reyes et al., 1998;

Antonio et al., 1999). Come per molti altri elementi, la correlazione tra il Cd e la neurodegenerazione è evidente in situazioni di esposizione acuta: è stato riportato ad esempio che l'intossicazione acuta da Cd in lavoratori addetti alla saldatura comporta la manifestazione di sintomi parkinsoniani (Okuda et al., 1997). L'esposizione al cadmio sembra essere la causa della sclerosi laterale amiotrofica (Bar-Sela et al., 2001) e del morbo di Parkinson (Okuda et al., 1997). Negli ultimi anni diverse evidenze supportano l'implicazione dei metalli, come il Cd, come potenziali cofattori di rischio nella patologia di Alzheimer (AD) (Bocharova et al., 2005; Bush, 2000; Ricchelli et al., 2005). Il potenziale ruolo della tossicità del Cd nella AD origina dall'osservazione di: presenza di concentrazioni maggiori di Cd nel fegato (Lui et al., 1990), nel plasma (Basun et al., 1991), e nei tessuti cerebrali (Panayi et al., 2002) di individui affetti da AD rispetto alle persone sane; l'implicazione del Cd nella formazione dei grovigli neuro fibrillari della proteina tau (Jiang et al., 2007); l'implicazione del Cd nei processi di aggregazione del peptide β -amiloide (Syme and Viles, 2006; Yano et al., 2003) che secondo l'ipotesi della cascata amiloide svolge il ruolo principale nell'innescare della AD. Infine in un lavoro recente effettuato in vitro (Notarachille et al., 2013), è stata messa in evidenza la capacità del Cd di interagire con il peptide β -amiloide (1-42) agendo sul canale di quest'ultimo incorporato nella membrana così come sul peptide in soluzione, sia riducendo la frequenza del canale sia formando in soluzione aggregati larghi ed amorfi tendenti alla precipitazione, dati che supportano l'ipotesi di un ruolo di fattore di rischio esercitato dal Cd nello sviluppo dell' AD.

Capitolo 2

Danio rerio come modello

2.1 Origine e distribuzione



Il teleosteo *Danio rerio* è un piccolo pesce tropicale d'acqua dolce appartenente alla famiglia delle Cyprinidae un tempo classificato prima nel genere *Cyprinus* e successivamente nel genere *Brachydanio*, originario del fiume Gange, nella regione del nord-est dell'India (Spence et al., 2008). Questo ciprinide è diffuso in Asia specialmente in India, Pakistan, Burma e Nepal ed abita acque poco profonde, correnti

e ferme, stagnanti, risaie, canali e ruscelli che possono avere un range di temperatura molto ampio tra 24°C e 38°. Queste regioni geografiche sono caratterizzate da un clima monsonico in cui si alternano stagioni secche a stagioni con piogge frequenti, pertanto queste condizioni ambientali altamente variabili confermano con grande evidenza che gli esemplari di questo pesce si adattano perfettamente ad oscillazioni climatiche abbastanza frequenti.

Classificazione scientifica

Dominio Eukaryota

Regno Animalia

Phylum Chordata

Classe Actinopterygii

Ordine Cypriniformes

Famiglia Cyprinidae

Sottofamiglia Danioninae

Genere Danio

Specie ***D. rerio***

2.2 Caratteristiche anatomiche e comportamento

Danio rerio è un piccolo pesce, lungo dai 3 ai 5 cm, molto attivo e costantemente in superficie. Generalmente vive in branchi composti dai 5 ai 20 individui che si muovono in modo sincrono in superficie. Alla bocca presenta un paio di barbigli. La livrea prevede una base argentea e dorata, un dorso verde-olivastro e un ventre bianco argenteo. I fianchi sono un'alternanza tra decise linee orizzontali chiare (bianche o giallo-oro) e linee scure blu cobalto a volte tendenti al viola; queste linee percorrono orizzontalmente tutta la lunghezza del corpo dalla testa alla pinna caudale. La coda e la pinna caudale sono striate di bianco e di blu, la dorsale è blu orlata di bianco, le altre pinne sono olivastre. La bocca è rivolta in alto, le pinne pelviche non presentano disegni mentre la pinna anale e quella caudale presentano un disegno a righe continue. La pinna caudale è molto arretrata. Questa specie presenta anche un certo dimorfismo sessuale: le femmine sono solitamente più lunghe con un profilo convesso e meno snelle dei maschi, inoltre solitamente presentano ventre biancastro e hanno strisce argentee e non dorate. I maschi sono a forma di siluro e hanno ventre piatto.



A sinistra maschio di *D.rerio*; a destra femmina di *D.rerio*

2.3 Ciclo e comportamento riproduttivo

La riproduzione inizia principalmente durante la stagione dei monsoni, un periodo in cui abbondano le risorse (Talwar and Jhingran, 1991). I pesci depongono le uova all'alba, lungo i margini dei canali, ruscelli, spesso in acque poco profonde e ricche di vegetazione. Le femmine rilasciano le uova sul fondale e non c'è cura prenatale. Le uova si sviluppano entro 48-72h a 28.5°C. Dopo la schiusa le larve aderiscono alle superfici immerse, mediante cellule specializzate sulla testa (Eaton and Farley, 1974). Dalle 24-48h dopo la schiusa, le larve iniziano a nutrirsi del piccolo zooplankton.

Gli esemplari di *Danio rerio* raggiungono la maturità sessuale tra i 3-6 mesi dopo la nascita, in laboratorio, anche se questo può variare notevolmente in relazione alle condizioni ambientali, soprattutto densità di allevamento e disponibilità di cibo (Spence et al., 2008). Di conseguenza è preferibile considerare la maturità sessuale in base alla grandezza del pesce piuttosto che all'età. Infatti numerosi studi riferiscono che la lunghezza considerata come riferimento per indicare la raggiunta maturità sessuale di *Danio rerio* è di 23mm (Eaton and Farley, 1974; Spence et al., 2008).

Stimoli olfattivi giocano un ruolo determinante nella riproduzione di questo pesce. Il rilascio di ormoni maschili in acqua induce l'ovulazione nelle femmine. Gerlach (2006) riporta che femmine esposte a ferormoni maschili hanno mostrato aumenti significativi nella frequenza di riproduzione, nelle dimensioni e della vitalità uovo rispetto alle femmine tenute in isolamento. La riproduzione è influenzata anche dal fotoperiodo. L'ovulazione si verifica più tipicamente appena prima dell'alba (Selman et al., 2005) e la deposizione delle uova inizia entro le prime ore di luce (Spence et al., 2008; Engeszer et al., 2007). Tuttavia, la deposizione delle uova non è strettamente limitata a questo periodo di tempo. In laboratorio i pesci si riproducono nel corso dell'intera giornata, anche se la deposizione delle uova è più intensa al mattino presto. Il rito di corteggiamento da parte dei maschi avviene prima e durante la deposizione delle uova. Durante il corteggiamento i maschi nuotano in un ambiente ristretto, con le pinne sollevate, affiancati alle femmine. Quando avviene la deposizione delle uova, il maschio nuota parallelamente alla femmina quasi ad avvolgerla con il suo corpo innescando la deposizione delle uova e rilasciando contemporaneamente lo sperma (Spence et al., 2008). Questo rituale di accoppiamento ed il fatto che i maschi sono noti per stabilire e difendere il territorio indicano che le femmine sono particolarmente selettive, ciò è dimostrato dal fatto che le femmine depongono più frequentemente quando accoppiate a certi maschi.

2.4 Sviluppo embrionale di Danio rerio

Il processo di sviluppo di *Danio rerio* è stato ampiamente studiato da Kimmel e dal suo gruppo. Esso è considerato regolare se l'organismo viene allevato ad una temperatura di 28.5°C, ma è possibile accelerare il processo mediante un aumento di temperatura. I pesci si sviluppa da uova telolecitiche (gran parte dell'uovo è occupato da un abbondante tuorlo e le cellule sono confinate ad un polo della sfera) e meroblastiche (i solchi di divisione cellulare non attraversano il tuorlo, ma suddividono unicamente il blastodisco, una piccola regione priva di tuorlo allocata al polo animale dell' uovo). Questo specifico tipo di segmentazione meroblastica viene definita discoidale. Il contenuto del tuorlo nutre l'embrione.

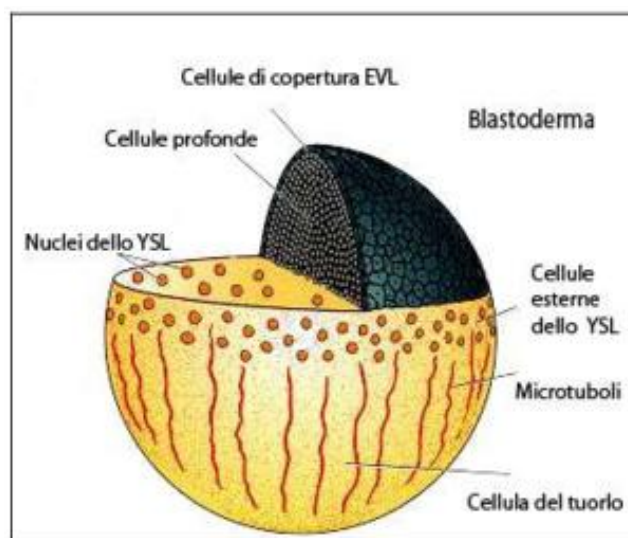
L'ingresso del gamete maschile nella cellula uovo è seguito da un influsso di calcio che modifica la permeabilità della membrana di quest' ultima, evitando la possibilità di una fecondazione multipla. Il calcio, inducendo riarrangiamenti citoscheletrici dei filamenti di actina, determina uno spostamento del citoplasma verso il polo animale, in posizione opposta al punto di entrata dello spermatozoo: lo zigote, dalla forma iniziale appiattita, diviene progressivamente cupoliforme.

Dopo circa 45 minuti avviene la prima divisione mitotica giungendo allo stadio di blastula in un paio d'ore. Le divisioni segmentali dell' embrione dopo la fecondazione sono sincrone ed incomplete a causa della prevalenza del vitello e riguardano solo il blastodisco. Le cellule che vengono così a formarsi rimangono collegate al tuorlo mediante ponti citoplasmatici formando un unico sincizio: molecole di taglia inferiore a 17 kDa possono passare liberamente da un blastomero a quello vicino. All'inizio

della decima divisione cellulare inizia la trascrizione zigotica, la quale segna il passaggio detto “*mid-blastula-transition*” (MBT, tra le 2 e le 3 hpf); da questo momento le divisioni cellulari rallentano e diventano asincrone.

A tale stadio sono distinguibili tre popolazioni cellulari:

- *Yolk syncitial layer* (YSL)/cellule sinciziali del tuorlo: cellule collocate al bordo vegetale del blastoderma, fuse con le cellule del tuorlo sottostante;
- *Enveloping layer* (EVL)/cellule del rivestimento: strato più superficiale ed esterno del blastoderma, disposte in un unico sottile strato;
- *Deep cells*/cellule profonde: cellule intermedie tra le due sopra citate, che andranno a formare l’embrione vero e proprio.



Rappresentazione dello stadio di blastula

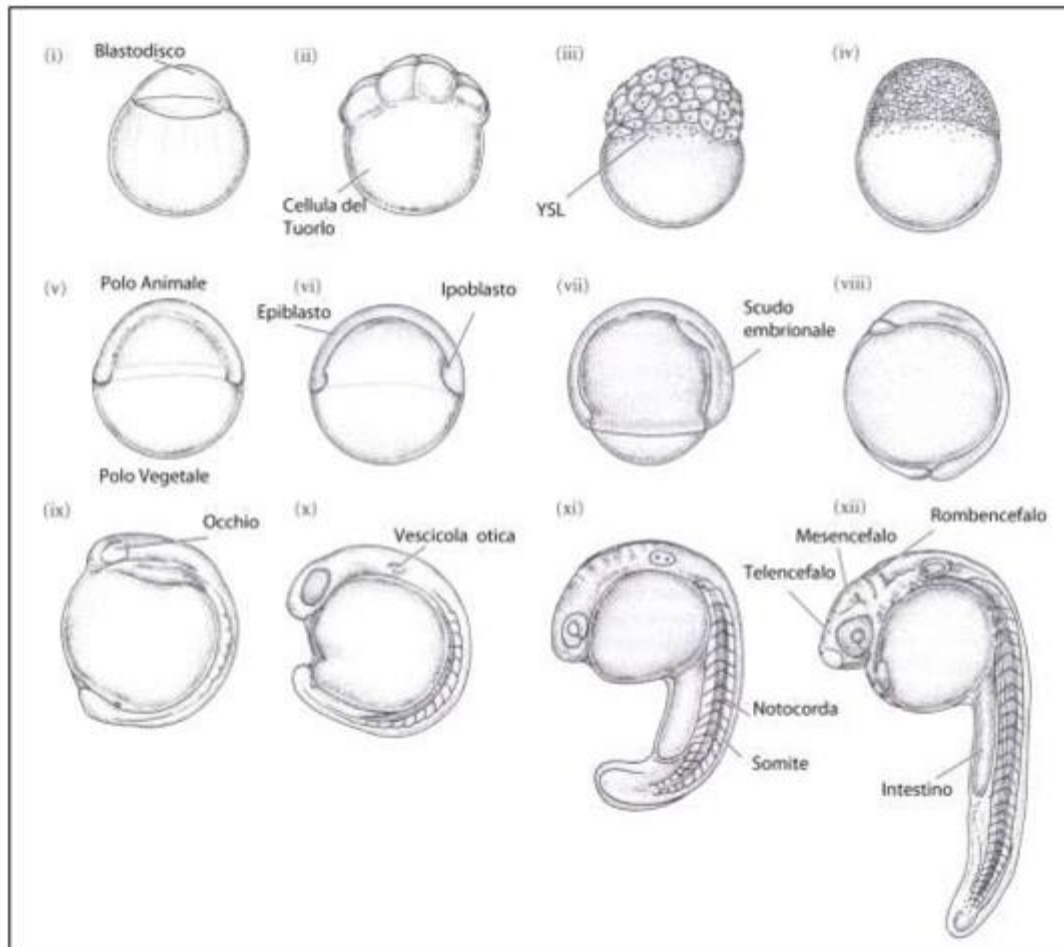
La gastrulazione è l'insieme dei movimenti morfogenetici che portano i territori presuntivi nella loro sede definitiva. Essa si compone di epibolia ed embolia. L'epibolia è il primo movimento delle cellule del blastoderma; le *deep cells* si muovono verso l'esterno intercalandosi nell'*envelope layer*, così da scorrere sopra il polo vegetale ed andare a circondare completamente il tuorlo. Quando le cellule dell'EVL si trovano molto vicine alle cellule YSL e formano un sottile strato intorno al tuorlo, inizia un secondo movimento cellulare; le EVL e le *deep cells* tornano molto velocemente verso la parte superiore del tuorlo mentre le YSL continuano a muoversi attorno al tuorlo. Questi movimenti portano alla formazione di due strati cellulari (definiti foglietti) sovrapposti, uno esterno definito epiblasto che andrà a costituire il futuro ectoderma, ed uno interno definito ipoblasto ossia il futuro mesendoderma.

Una volta formatosi l'ipoblasto, le cellule di quest'ultimo andranno ad intercalarsi con le cellule dell'epiblasto a livello del futuro lato dorsale, generando così un ispessimento definito scudo embrionale (*embryonic shield*), una struttura fondamentale nello stabilire la formazione dell'asse dorso-ventrale. Il mesendoderma si suddivide in due strati: mesoderma ed endoderma. L'embrione a questo stadio avrà tre distinti foglietti embrionali: ectoderma, mesoderma ed endoderma a partire da ciascuno dei quali hanno origine precise regioni anatomiche. Dall'ectoderma derivano sistema nervoso ed epidermide, il mesoderma dà origine a cuore, sangue, muscoli ed ossa, l'endoderma, infine, genera i vari tratti del tubo digerente e gli organi ad esso associati.

A partire dalle 10 hpf e fino alle 24 hpf ha luogo il periodo di somitogenesi, durante il quale una serie di movimenti morfogenetici porterà alla formazione dei somiti. Allo stadio di 24 hpf l'embrione assume un'evidente struttura bilaterale; l'osservazione allo stereo-microscopio permette di riconoscere gli occhi, gli otoliti, i somiti, i dotti pronefrici e la notocorda.

Tra le 36 e le 48 hpf (*Pharyngula period*), a partire da una regione ventrale, ha luogo la formazione dei sette archi faringei; iniziano a formarsi lateralmente due strisce di melanociti, gli abbozzi delle pinne e diverrà visibile la pompa cardiaca e la dinamica delle cellule del sangue.

In genere entro le 72 hpf si ha la schiusa (*Hatching period*) e l'embrione esce dal corion. Ordinariamente vengono definiti “embrioni” organismi fino a tre giorni dopo la fecondazione; successivamente sono denominati “larve” natanti.



Principali stadi dello sviluppo embrionale di *Danio rerio*

2.4.1 Principali fasi dello sviluppo embrionale

Nel corso dello sviluppo embrionale di *Danio rerio* si susseguono una serie di fasi facilmente riconoscibili suddivise in periodi secondo Kimmel et al., 1995:

Zygote Period (0-3/4 hpf)

Cleavage Period (3/4-2^{1/4} hpf)

Blastula Period (2^{1/4}-5^{1/4} hpf)

Gastrula Period (5^{1/4}-10 hpf)

Segmentation Period (10-24 hpf)

Pharyngula Period (24-48 hpf)

Hatching Period (48-72 hpf)

Early larval Period

L'uovo appena fecondato rientra nel periodo di zigote fino a quando insorge la prima divisione (più o meno 40 minuti dopo la fecondazione) ed in questo stadio ha un diametro di circa 0,7 mm. Dopo la prima scissione, le cellule, o blastomeri, si dividono in maniera sincrona, ad intervalli di circa 15 minuti. Durante il *cleavage period* l'embrione passa da uno stadio a due cellule ad uno stadio di 64 cellule collegate tra loro da ponti citoplasmatici.

Il periodo compreso tra lo stadio a 128 cellule e l'inizio della gastrulazione è noto come blastula. In questa fase l'orientamento del piano di divisione risulta essere indeterminato e le cellule non più disposte in maniera ben organizzata; l'embrione muta determinando il passaggio da forma sferica ad oblunga. Importanti processi caratterizzano il periodo di blastula, tra cui il passaggio dell'embrione in MBT e quindi l'attivazione della trascrizione genica, la formazione del YSL e l'inizio dell'

epibolia in una fase di blastula tardiva (Solnica-Krezel and Driever, 1994), che sarà portata avanti durante la successiva gastrulazione.

Lo stadio di gastrula è caratterizzato dalla presenza di movimenti cellulari morfogenetici di involuzione, convergenza ed estensione che conducono alla formazione dei foglietti embrionali primari e dell'asse embrionale. Ciascun foglietto embrionale (ectoderma, mesoderma ed endoderma) risulterà essere localizzato nel posto giusto in modo tale che gli organi e i tessuti corporei da essi derivanti possano formarsi nelle corrette posizioni. L'involuzione porta alla formazione dell' *anello germinale* mediante ripiegamento su se stesso del blastoderma. Movimenti di convergenza poi, producono un accumulo locale di cellule lungo l'anello germinale, determinando la formazione del cosiddetto *scudo embrionale* che andrà a costituire il lato dorsale dell'embrione e le regioni pericardiche a livello ventrale. Durante questi eventi il fenomeno dell'epibolia si arresta temporaneamente, per poi riprendere dopo la formazione dello scudo. Dalla *piastra precordale*, all'interno del polo animale, si andranno a sviluppare, invece, le strutture della testa. Il periodo di gastrula termina con il completamento dell'epibolia e con la formazione dell'abbozzo della coda.

Segue la fase di segmentazione che va dalle 10 alle 24 hpf. Durante questo periodo si ha la formazione di derma, vertebre e muscolo scheletrico; inizia lo sviluppo degli organi primari e dei somiti, l'embrione si allunga con un abbozzo caudale che è diventato molto più prominente e gli assi antero-posteriore e dorso-ventrale risultano adesso ben definiti. Il tubo neurale e la notocorda continuano a formarsi e hanno inizio

le prime suddivisioni dell' encefalo. Questa è la fase in cui compaiono anche i primi movimenti del corpo.

Superate le 24 ore l'asse corporeo comincia a raddrizzarsi e allo stesso modo la testa, che si solleva dorsalmente. In questa fase (*pharyngula period*) la notocorda è ben sviluppata, il sistema nervoso è cavo e in espansione a livello anteriore ed il cervello risulta diviso in 5 lobi ben distinti. Cominciano a formarsi gli abbozzi delle pinne pettorali ed il settimo arco faringeo si sviluppa molto rapidamente, mentre il sistema circolatorio risulta essere già costituito da un cuore che batte per la prima volta e da un circuito chiuso di canali in cui scorre il sangue.

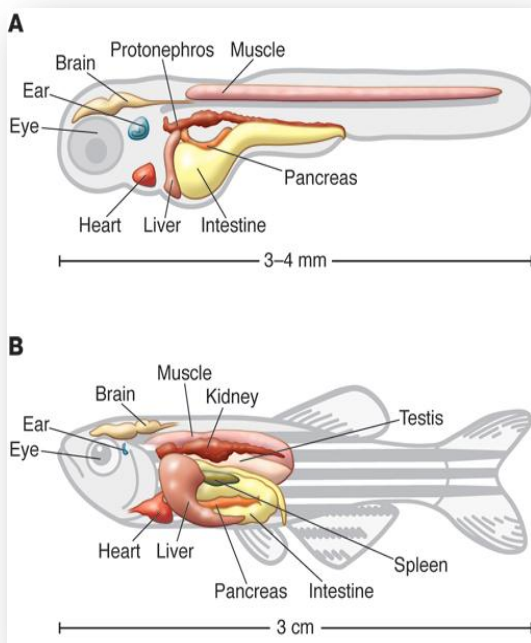
Tra il secondo ed il terzo giorno dello sviluppo (a temperatura standard) si ha il fenomeno dell' *Hatching* ovvero la “schiusa” in quanto l'embrione si libera del corion, la struttura membranosa che lo proteggeva fino a quel momento; solo occasionalmente questo evento si verifica superate le 72 ore. Che l'embrione sia o meno decorionato, il suo sviluppo progredisce, ora per ora, e generalmente individui che si sono decorionati spontaneamente non sono evolutivamente più avanzati rispetto a quelli che sono rimasti nei loro corion (Kimmel *et al.*, 1995). In questa fase del suo sviluppo l'embrione continua a crescere più o meno con la stessa frequenza di prima. La morfogenesi di molti degli organi rudimentali è ora piuttosto completa e rallenta considerevolmente, con alcune importanti eccezioni che includono l'intestino e gli organi ad esso associati. Notevolmente visibili sono il rapido sviluppo delle rudimentali pinne pettorali, che rappresentano un' utilissima caratteristica per la

stadiazione, lo sviluppo di mascelle e branchie, la formazione del primo osso visibile in *Danio rerio*, il cleithrum, localizzato tra i primi due miotomi. La bocca appare spalancata e sporge appena oltre l'occhio.

Durante il terzo giorno la larva decorionata ha completato la maggior parte della sua morfogenesi e continua a crescere rapidamente. Importanti cambiamenti che si verificano nel giorno successivo includono lo sviluppo della vescica natatoria e la continua protrusione antero-dorsale della bocca. Le strisce riflettenti degli iridofori si illuminano e si allungano, la banda di vitello in posizione ventrale si estende in entrambe le direzioni. Il tubo intestinale si sposta più ventralmente e l'estensione del vitello è quasi nulla. Mentre nel periodo di *Hatching* l'embrione è solitamente a riposo, la piccola larva inizia gradualmente a nuotare, a muovere le sue mascelle, i lembi opercolari, le pinne pettorali e gli occhi. Uno sviluppo in questo senso consente rapide risposte di fuga, la respirazione, la ricerca di prede e la capacità di alimentarsi.

2.5 *Danio rerio* come organismo modello

Con la biologia molecolare si è evoluto il concetto di organismo modello, come specie estensivamente studiata per comprendere particolari fenomeni biologici. Perché un organismo possa essere considerato modello è necessario che risponda ad una serie di



Organi di Zebrafish allo stadio larvale (A) e allo stadio adulto (B); stadio larvale è inteso dai 3 ai 5 giorni post-fertilizzazione (Santoriello and Zon, 2012)

caratteristiche, le più comuni sono le dimensioni, il tempo di generazione, l'accessibilità, la manipolazione, la genetica, la conservazione dei meccanismi ed un potenziale beneficio economico. A differenza di alcuni modelli classici della genetica, come *Drosophila* e il verme *Caenorhabditis*, che presentano evidenti limiti legati alla distanza evolutiva dall'uomo, come ad esempio un sistema nervoso dallo sviluppo rudimentale e privo di

cervello, *D.rerio*, essendo un vertebrato, rappresenta un sistema modello molto più informativo della condizione umana. Innanzitutto le ridotte dimensioni dell'animale adulto, circa 3 cm di lunghezza, rendono semplice ed economico l'allevamento di un gran numero di individui. La maturità sessuale è raggiunta in poco tempo, 3 mesi, e si possono ottenere uova fecondate in tutte le stagioni mantenendo costante foto- e

termo-periodo (14 h di luce a 10 h di buio, a 28,5 °C). La fecondazione esterna permette di seguire agevolmente tutti gli stadi dello sviluppo embrionale mediante l'utilizzo di opportuni marcatori, o di monitorare ad ogni stadio l'espressione di specifici geni. Le piccole dimensioni di embrioni e larve consentono di minimizzare il costo ed i rifiuti per gli studi di droghe e di sostanze tossiche. La rapidità dello sviluppo embrionale, la trasparenza degli embrioni, le dimensioni e la facile manipolazione delle uova fecondate, permettono di applicare numerose tecniche sperimentali che rendono interessante l'uso del pesce zebra in diversi ambiti della biologia dalla biochimica alla biologia comportamentale. *Danio rerio* è utilizzato come specie per i test eco-tossicologici per determinare effetti di prodotti chimici sulla sopravvivenza della fauna marina, crescita e riproduzione (Dave et al., 1981; Bresch et al., 1990).

Molti geni dello sviluppo, responsabili di malattie congenite nell'uomo, possiedono una controparte in questo pesce, il cui genoma è sorprendentemente simile a quello umano nonostante i 450 milioni di anni di evoluzione che separano le due specie. Inoltre gli organi di questo pesce sono funzionalmente e morfologicamente simili a quelli dell'uomo. La crescente disponibilità di mutanti favorisce l'identificazione dei geni responsabili di sindromi ereditarie e di predisposizioni genetiche di vario tipo, per esempio neuro degenerazioni e tumori. La possibilità di ottenere mutazioni puntiformi su singoli geni mediante l'agente etilnitrosoare (ENU) e di inserzioni (Santoriello and Zon, 2012) ha permesso di identificare mutanti con difetti dello sviluppo in diversi organi e sistemi. Tali mutanti hanno un ruolo fondamentale non solo nel chiarire la

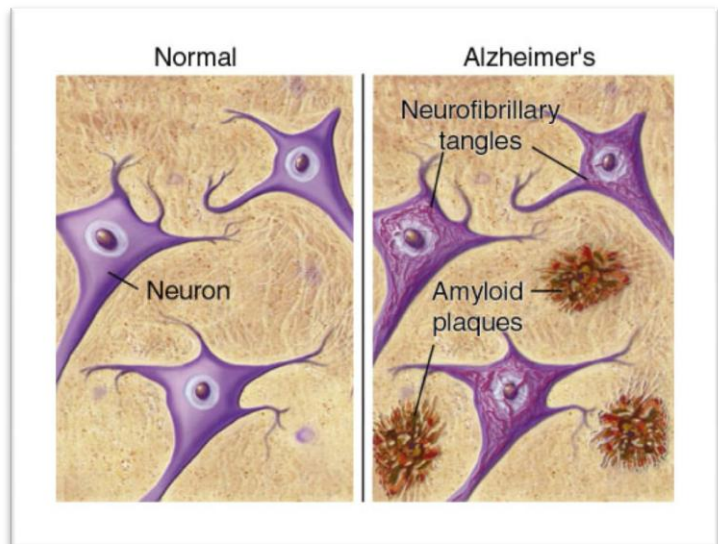
funzione di vari geni nello sviluppo embrionale, ma, in diversi casi, costituiscono ottimi modelli di malattie umane tra cui ad esempio malattie neurodegenerative (Tomasiewicz et al., 2002). Inoltre *Danio rerio* si sta affermando come un ottimo modello anche per studi comportamentali, volti a comprendere la relazione tra funzione dei geni e comportamento. Non ultime le applicazioni in ambito farmacologico, dove i limiti di modelli animali mammiferi vengono superati dall'uso di altri sistemi modello, tra cui il pesce zebra, ormai largamente utilizzato per lo sviluppo di nuovi farmaci (Kari e al., 2007).

2.5.1 Modello per le malattie neurodegenerative

Come affermato in precedenza, *Danio rerio* rappresenta un ottimo modello animale per lo studio delle malattie umane, infatti rispetto ad altri modelli vertebrati, mutanti di *Danio rerio* sono più facili da ottenere e meno costosi. Questi mutanti hanno permesso una migliore comprensione di diverse condizioni umane quali l'invecchiamento, disturbi del sangue, distrofia muscolare, autismo, ed in particolare malattie neurodegenerative quali Morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, malattia di Huntington (Xi et al., 2011). Tra queste, in particolare la malattia di Alzheimer (Alzheimer's Disease: AD) patologia neurodegenerativa, progressiva ed irreversibile, colpisce il cervello. Nell'anziano, rappresenta la più comune forma di demenza, intesa come una progressiva perdita delle funzioni cognitive; influisce, infatti, sulle capacità

di una persona di portare a termine le più semplici attività quotidiane, andando a colpire aree cerebrali che controllano funzioni come la memoria, il pensiero, la parola. Al morbo di Alzheimer è associata una consistente diminuzione dei livelli di acetilcolina, un neurotrasmettitore indispensabile per la comunicazione tra neuroni e quindi fondamentale per tutte le funzioni cognitive. Inoltre a tale patologia è associata anche un'eccessiva stimolazione neuronale da parte del Glutammato, effetto noto come eccitotossicità (Begni et al., 2004). Il Glutammato rappresenta il principale neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale. Durante l'invecchiamento, vi è un aumento progressivo extracellulare del Glutammato nel cervello e un aumento della sensibilità di alcuni neuroni agli effetti citotossici dello stesso (Choi et al., 2014). Questa patologia si caratterizza per la presenza in sede extracellulare di aggregati proteici chiamati placche senili, costituiti principalmente dal peptide β -amiloide; e per la presenza di grovigli neurofibrillari intracellulari contenenti la proteina Tau iperfosforilata (Xi et al., 2011). Il peptide β -amiloide viene prodotto mediante taglio proteolitico della proteina precursore dell'amiloide denominata APP (Amyloid precursor protein).

Normalmente l'APP subisce taglio proteolitico ad opera di due proteasi: α -secretasi e γ -secretasi, che agiscono in modo sequenziale generando sAAP α ed il peptide P3, i quali hanno una funzione neuroprotettiva. In alternativa l'APP



può subire processamento proteolitico ad opera della β -secretasi e della γ -secretasi; in particolare la β -secretasi (BACE1) taglia all'N terminale dell'APP, generando un frammento C-terminale ancorato alla membrana (CTF β) e un frammento N-terminale solubile chiamato sAPP β . La γ -secretasi opera il taglio sul frammento C-terminale generando un peptide chiamato "APP intracellular domain" (AICD) ed i peptidi A β 40 e A β 42. Questi peptidi insolubili, in particolare A β 42 si aggregano a formare depositi di fibrille amiloidi in sede extracellulare, formando le placche senili. Tali depositi hanno un effetto tossico sul neurone, determinano stress ossidativo, infiammazione e quindi morte neuronale.

Molti dei geni umani che codificano per gli enzimi necessari per le modificazioni post-traduzionali di APP sono stati trovati con una elevata percentuale di somiglianza amminoacidica in *Danio rerio*. Questo pesce presenta due geni simili all'APP umana: appa e appb. Durante la gastrulazione, entrambi i geni app sono espressi nell'intero embrione, mentre a 24 HPF (post-fertilizzazione), appa e appb sono espressi in telencefalo, nei gangli del trigemino e nella linea gangliare laterale posteriore.

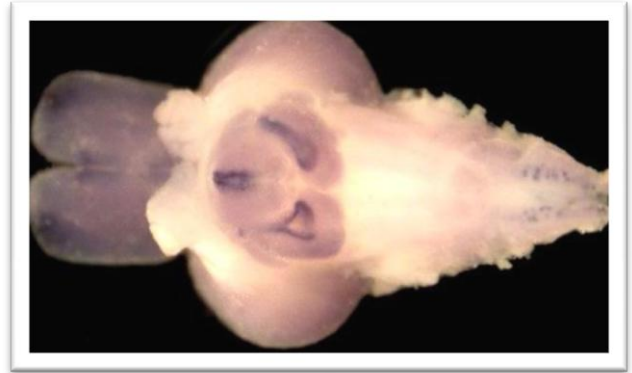
Ortologi dei complessi della β -secretasi e γ -secretasi si trovano in *Danio rerio* e sono espressi nel sistema nervoso centrale. Nonostante la conservazione del dominio A β e delle secretasi con gli esseri umani, il peptide A β di *Danio rerio* deve ancora essere trovato e non è noto se le modificazioni post- traduzionali che si verificano per il processamento dell'APP umano si verificano anche in *Danio rerio* (Xi et al., 2011).

Capitolo 3

IL sistema nervoso di Danio rerio

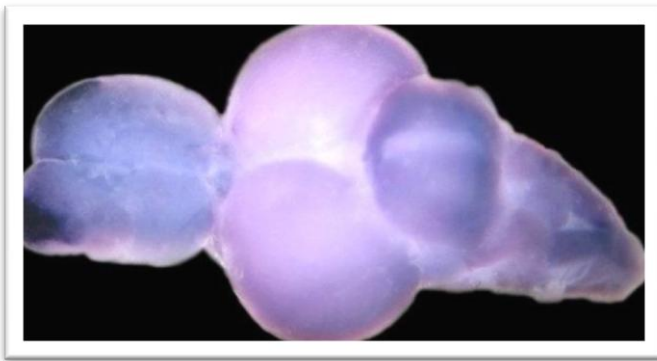
3.1 L'encefalo di *Danio rerio*

Il primo passo nella costruzione del sistema nervoso è la formazione della piastra neurale, attraverso un processo chiamato induzione neurale. Tale processo ha luogo in una fase di sviluppo molto precoce, precedente o concomitante alla gastrulazione. Come in altri vertebrati, la



Encefalo di *Danio rerio* visione ventrale

formazione della piastra neurale all'interno dell'embrione *Danio rerio* integra attività antagoniste di diverse vie di segnalazione, come induttori meso ed endodermici (Nodal/TGF β) (Jia et al., 2009) ed induttori neurali (FGFs, Wnts). Il processo



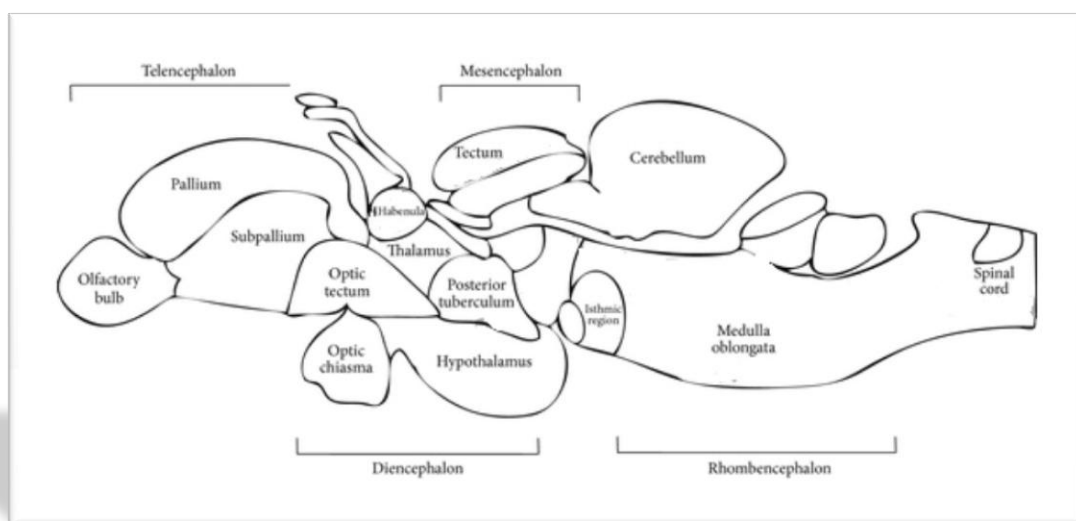
Encefalo di *Danio rerio* visione dorsale

successivo mediante il quale dalla piastra neurale si forma il tubo neurale di *Danio rerio* è chiamato neurulazione. Nonostante questo processo si verifichi in due fasi i movimenti morfogenetici ed i meccanismi molecolari sono molto

simili a quelli che si verificano in altri

vertebrati (Geldmacher-Voss et al., 2003). Poiché lo sviluppo del sistema nervoso di *Danio rerio* segue il vertebrato Bauplan, l'organizzazione generale del sistema nervoso centrale di *Danio rerio* è molto simile a quella di altri vertebrati. Lungo l'asse antero-

posteriore, il sistema nervoso centrale può essere suddiviso in tre regioni: prosencefalo (suddiviso a sua volta in telencefalo e diencefalo), mesencefalo e romboencefalo (suddiviso in cervelletto e midollo allungato). La corda spinale rappresenta la parte più caudale del sistema nervoso centrale, protetta dalla colonna vertebrale. Essa si continua anteriormente con il romboencefalo, la parte più caudale dell'encefalo, all'interno del cranio. Il proencefalo è la parte più rostrale e larga del cervello, separata dal romboencefalo per mezzo del mesencefalo. Il proencefalo nei mammiferi rappresenta la parte prominente del cervello, che in *Danio rerio* è invece rappresentata dal romboencefalo.



Rappresentazione schematica dell'organizzazione dell'encefalo di *D.rerio*

➤ **Telencefalo:** in *Danio rerio* origina da un meccanismo di eversione della parte basale del tubo neurale embrionale come in altri pesci attinopterigi, anzi ch  attraverso un meccanismo di evaginazione come in altri vertebrati, alterando la topologia delle aree palliali, rispetto ad altri mammiferi o amnioti. Il telencefalo   suddiviso in

subpallio ventrale e pallio dorsale, una regione che richiede molteplici forme e disposizioni neuronali nei vertebrati. Tuttavia, può essere considerato come un campo omologo alla corteccia cerebrale dei mammiferi (Wullimann and Mueller, 2004). Inoltre, l'organizzazione e i collegamenti tra i diversi palli di *Danio rerio* sono più complessi che nei primi attinopterigi, per cui non può essere facilmente confrontato con quello dei tetrapodi. Sulla base di queste connessioni neuronali e l'analisi dei movimenti morfogenetici, è molto probabile che in *Danio rerio* l'omologo del pallio mediale risulti lateralmente (che riceve in ingresso stimoli multisensoriali dai nuclei del tubercolo posteriore, ma non dal bulbo olfattivo), mentre il pallio laterale si trova medialmente. Quest'ultimo è rivolto verso le afferenze del bulbo olfattivo, soprattutto nella zona posteriore, e potrebbe essere omologo alla corteccia olfattiva dei mammiferi. Esso contiene molti neuroni GABA, che possono essere interneuroni, la cui origine è ancora incerta. Inoltre il pallio riceve afferenze immunoreattive distribuite irregolarmente, per diversi peptidi quali somatostatina, neuropeptide Y, colecistochinina. Il subpallio ventrale di *Danio rerio* può essere diviso in due parti: dominio ventrale del telencefalo, parte dorsale e dominio ventrale del telencefalo, parte ventrale. La parte dorsale del dominio ventrale del telencefalo presenta omologie con lo striato dei tetrapodi in particolare per il contenuto di sostanze neuronali immunoreattive e l'alta densità dei neuroni GABA (Mueller et al., 2006). La parte ventrale del dominio ventrale del telencefalo mostra caratteristiche critiche che lo identificano come la formazione del setto. Una delle principali caratteristiche è che

solo in questa regione telencefalica sono stati rilevati neuroni colinergici (Mueller et al.,2004).

➤ **Diencefalo:** corrisponde ai primi tre prosomeri del proencefalo, può essere suddiviso in epitalamo dorsale, talamo laterale ed ipotalamo ventrale. Il tubercolo posteriore può essere definito come la parte ventrale dei prosomeri 2 e 3, e può eventualmente essere esteso alla porzione ventrale del prosomero I (Vernier and Wullimann 2009). L'area periventricolare del tubercolo posteriore mostra tre componenti, il nucleo del tubercolo posteriore, l'organo paraventricolare e le cellule ependimali che negli amnioti, mostrano una differenziazione specifica in continuità con la parete periventricolare dell'ipotalamo.

L'epitalamo contiene un piccolo centro, chiamato abenula, che è connesso con il sistema limbico del telencefalo. Il complesso pineale-parietale è costituito dalla ghiandola endocrina pineale. La principale funzione di questo complesso è la regolazione dei comportamenti ciclici in relazione ai cicli diurni e stagionali della lunghezza del giorno. Il talamo forma la parete laterale del terzo ventricolo. I nuclei talamici dorsali costituiscono una stazione di collegamento per le informazioni somatosensoriali, visive, uditive dirette al telencefalo ed hanno con quest'ultimo altre interconnessioni reciproche. L'ipotalamo corrisponde alla parte basale del diencefalo, esso comprende sia una componente basale che una componente alare. L'area preottica generalmente è associata all'ipotalamo, anche se occupa una posizione intermedia tra l'ipotalamo e il subpallio. La parte alare dell'ipotalamo include

principalmente i nuclei sopraottico, paraventricolare e soprachiasmatico. Localizzato proprio al di sopra del chiasma ottico, come si evince dal suo nome; esso gioca un ruolo fondamentale nella regolazione del ritmo circadiano. La parte basale dell'ipotalamo è suddivisa in parte ventrale e dorsale, in cui sono localizzati diversi nuclei quali: nucleo retrochiasmatico, ventromediale, inoltre comprende il nucleo subtalamico. Accanto alle proiezioni sull'ipofisi, le aree ipotalamiche hanno numerose interconnessioni con molte aree del cervello. Essi includono diverse interconnessioni tra l'area preottica e l'ipotalamo, che possono giocare un ruolo importante nel comportamento alimentare, corteggiamento e nella riproduzione (Bass and Grober, 2001), ed input crescenti dalla parte mediale dell'ipotalamo sul subpallio (Rink and Wullimann 2002), che può regolare la ricerca del cibo ed un atteggiamento aggressivo. L'ipotalamo inoltre è coinvolto nel controllo della temperatura corporea, della pressione sanguigna e nel ritmo sonno-veglia.

Durante lo sviluppo embrionale, da un'estroflessione ventrale dell'ipotalamo che si unisce ad un'estroflessione dorsale della volta della cavità orofaringea che progressivamente perde il collegamento con il canale digerente, si forma l'ipofisi. Come in altri vertebrati la ghiandola pituitaria o ipofisi si compone di due parti principali, quali l'ipofisi posteriore ed ipofisi anteriore. L'ipofisi posteriore o pars nervosa corrisponde principalmente alle terminazioni nervose dei nuclei sopraottico e paraventricolare dei neuroni ipotalamici, secernenti vasotocina e isotocina, omologi rispettivamente di vasopressina ed ossitocina dei mammiferi (Berman et al., 2009).

L'ipofisi anteriore è composta da due lobi, la pars distalis e la pars intermedia. La pars distalis si compone di diversi tipi di cellule che secernono ormoni quali: ACTH, PRL, TSH, GH, LH, FSH (Takey and Loretz, 2006). Nella parte più caudale della corda spinale un gruppo di neuroni, le cellule Dahlgren, sono localizzati in posizione ventrale del canale centrale. Essi proiettano sulla urofisi, un organo neurale secernente urotropina e acetilcolina. Questo sistema è molto simile alla neuroipofisi e gioca diversi ruoli, ad esempio interviene nella regolazione della attività della muscolatura liscia e l'osmolarità del sangue (Parmentier et al., 2006).

➤ **Mesencefalo:** come in altri vertebrati comprende tre aree principali quali: il peduncolo cerebrale, il tegmentum ed il tectum o tetto. Il peduncolo cerebrale contiene fasci di fibre provenienti dal telencefalo. L'area del tegumento contiene i nucleo rosso, nuclei dei nervi craniali e parti della formazione reticolare, ma non equivalgono alla substantia nigra o all'area tegmentale ventrale, una delle principali differenze con gli altri gruppi di vertebrati. Il tetto gioca molti ruoli nel controllo dei movimenti dell'occhio, dove i neuroni sono organizzati in strati. La maggior parte delle fibre provenienti dalla retina termina negli strati superficiali del tetto. Anche se la principale afferenza è visiva, il tetto ottico è un centro multisensoriale in quanto riceve afferenze anche dai sistemi uditivo, somatosensitivo ed elettrocettivo. Le fibre discendenti del tetto mesencefalico sono dirette ai centri motori del tegmentum e alla formazione reticolare. Le connessioni del tetto permettono ai pesci di localizzare gli stimoli nello spazio, come ad esempio quello provocato da una particella di cibo che cade verso il

fondo, e di dirigere i movimenti oculari e locomotori verso lo stimolo (Liem et al., 2002).

➤ ***Romboencefalo***: dal punto di vista evolutivo rappresenta la parte più antica del cervello dei vertebrati (Jackman et al., 2000), e la sua organizzazione consiste in una serie di sette o otto segmenti definiti rombomeri comuni alle altre specie di vertebrati. Questa conservazione è rilevabile nella morfologica e a livello molecolare (Gilland and Baker, 1993). Nell'adulto, il romboencefalo è composto posteriormente dal midollo allungato, antero-ventralmente dal ponte ed in posizione dorso-anteriore dal cervelletto. Come in tutti i vertebrati il romboencefalo è caratterizzato dall'associazione con i principali nervi craniali, il trocleare (IV), trigemino (V), abducente (VI), facciale (VII), ottico(VIII), glossofaringeo (IX) e vago (X). I nervi cranici possono avere sia componenti sensoriali che motorie e quelli derivati dal romboencefalo sono responsabili di un'ampia varietà di comportamenti, compreso il gusto, l'udito, l'equilibrio, la masticazione, le espressioni facciali, alcuni movimenti oculari, e nei vertebrati terrestri, la secrezione di lacrime e saliva. I nervi cranici associati al romboencefalo innervano anche gli adiacenti archi faringei, che si trovano sulla superficie ventrale della testa, e che come lo stesso romboencefalo, mostrano un'organizzazione segmentale. La segmentazione del romboencefalo e degli archi faringei sono intimamente collegati, con le cellule della cresta neurale che compongono le ossa, le cartilagini e i tessuti connettivi degli archi faringei (Moens and Prince, 2002). In *Danio rerio*, le cellule della cresta neurale che sorgono

dorsalmente nei rombomeri r1 - r3 migrano nel primo arco faringeo per formare le mascelle (Schilling e Kimmel, 1994). Queste stesse strutture sono innervati dal V nervo cranico, nervo branchiomotore (trigemino), che ha i suoi corpi cellulari in r1 - r3.

Il *cervelletto* nei pesci è piuttosto grande e può essere suddiviso in corpo del cervelletto, situato in posizione mediana, e in un paio di auricole cerebellari, in posizione laterale. I pesci attinopterigi presentano, inoltre, un'espansione del corpo del cervelletto denominata valvola del cervelletto. Le auricole ricevono impulsi dalla parte vestibolare dell'orecchio e dalla linea laterale; il corpo del cervelletto riceve afferenze da tutti i sistemi sensoriali del corpo ad eccezione dei recettori olfattivi e gustativi, mentre l'afferenza propriocettiva è molto rappresentata. Il ruolo cardine del cervelletto è quello di coordinare il movimento, infatti esso trasmette le informazioni principalmente all'area corticale motoria (Moens and Prince, 2002).

Il *midollo allungato* è il prolungamento craniale del midollo spinale, che contiene i nuclei sensitivi di terminazione e i nuclei motori di origine dei nervi cranici connessi a queste regioni dell'encefalo (dal V, il nervo trigemino, al X, il nervo vago) (Liem et al., 2002). I nuclei sensitivi del rombencefalo ricevono afferenze dai recettori cutanei generali, dai bottoni gustativi, dai recettori della linea laterale, dai recettori vestibolari (equilibrio e accelerazione) e dai recettori dei suoni. La maggior parte dei nuclei somatomotori innervano i muscoli branchiomerici delle mascelle e degli archi branchiali, ma alcuni di essi innervano anche i muscoli epibranchiali ed ipobranchiali. I nuclei visceromotori dei pesci inviano fibre parasimpatiche pregangliari al lobo

oculare, tramite il nervo oculomotore, e agli organi extracranici tramite il nervo vago (Liem et al., 2002).

Il Midollo ed il ponte formano il quarto ventricolo del cervello, ed insieme al mesencefalo, sono spesso denominati "tronco encefalico". Il tronco encefalico contiene un conglomerato di gruppi di cellule che formano una complessa rete definita formazione reticolare, che è coinvolta nel controllo di comportamenti di ordine superiore come la respirazione, la circolazione, e la veglia. La formazione reticolare può essere divisa in una parte ascendente e una discendente. La parte ascendente riceve impulsi sensitivi dalle parti inferiori del corpo e li ritrasmette al cervelletto, al tetto ottico e all'ipotalamo; inoltre influenza processi come sonno, risveglio e attenzione. La parte discendente trasmette efferenze ai motoneuroni del tronco cerebrale ed i centri motori del midollo spinale, e coordina le attività motorie ritmiche, come i movimenti oculari, l'assunzione di cibo e la deglutizione, la respirazione, la frequenza cardiaca e il nuoto (Liem et al., 2002).

I neuroni reticolospinali del tronco encefalico, rappresentano il percorso principale attraverso cui il cervello comunica con il midollo spinale per controllare la locomozione.

➤ **Midollo spinale:** come nei mammiferi, presenta la porzione centrale costituita da sostanza grigia che comprende i corpi delle cellule nervose, le fibre nervose mieliniche e le cellule gliali; mentre l'area circostante è costituita dalla sostanza bianca, costituita a sua volta da fibre nervose mieliniche, oligodendrociti e astrociti. La sostanza grigia ha una forma diversa rispetto a quella degli altri vertebrati, nei pesci

assume una forma di Y capovolta. Le due corna dorsali ricevono le terminazioni nervose dei neuroni sensitivi somatici e viscerali, mentre le corna ventrali contengono i nuclei dei motoneuroni. Nelle corna ventrali, inoltre, sono contenute anche le cellule intercalari a breve assone, che portano impulsi inibitori ai motoneuroni somatici e regolano il gioco dei muscoli antagonisti (Padoa E., 2002).

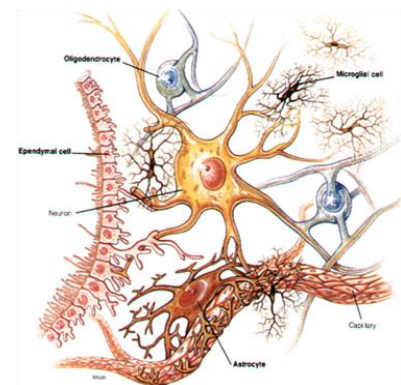
3.2 Citologia del sistema nervoso centrale

I maggiori circuiti di neurotrasmissione, come i glutammatergici (eccitatori) e GABAergici (inibitori), sono stati riscontrati nell'encefalo di *Danio rerio* (Wulliman and Reichert, 1996). In aggiunta ai maggiori neurotrasmettitori eccitatori ed inibitori, i recettori muscarinici colinergici sono stati confermati in estratti di encefalo di esemplari adulti di *Danio rerio* mediante metodo di legame con radioligando (Park et al., 2008). Inoltre, i neurotrasmettitori come GABA, serotonina, dopamina, istamina, glutammato ed acetilcolina sono stati trovati in *Danio rerio* (Panula et al., 2006). I principali tipi cellulari caratteristici del cervello dei mammiferi risultano nell'encefalo di questo teleosteo, come le cellule cerebellari del Purkinje (Koulen et al., 2000) e i motoneuroni (Westerfield et al., 1986), e le cellule della microglia (Peri and Nusslein-Volhard, 2008); la situazione invece risulta essere leggermente differente per quanto riguarda le cellule della glia. Gli oligodendrociti sono presenti nel sistema nervoso centrale di questo pesce seppur presentando una diversa composizione rispetto agli

oligodendrociti dei mammiferi per quanto riguarda le glicoproteine di membrana caratteristiche di questi tipi cellulari, importanti nella formazione, stabilità e mantenimento della guaina mielinica; le differenze vere e proprie riguardano le cellule dell'astroglia. A differenza del cervello dei mammiferi, l'encefalo di *Danio rerio*, così come quello degli altri pesci teleostei, presenta come principale tipo cellulare astrogliale, le cellule della glia radiale.

3.2.1 Cellule dell'astroglia

Nei Teleostei, l'astroglia è rappresentata in gran parte dalle cellule della glia radiale (Cuoghi and Mola, 2009). La glia radiale è la prima ad apparire durante l'ontogenesi dei Vertebrati che mostrano una complessa organizzazione gliale (Levitt e Rakic, 1980). Nei Mammiferi le cellule della glia radiale si riducono progressivamente e sono virtualmente assenti negli adulti (Pixley and De Vellis, 1984; Elmquist et al., 1994). Quelle presenti nel cervelletto prendono il nome di Glia di Bergmann e regolano la plasticità sinaptica. Nella retina la principale cellula della glia è la cellula di Müller che partecipa alla comunicazione bidirezionale con i neuroni (Seeley, 2005). Queste cellule sono caratterizzate da una forma di perla o di fuso, i cui corpi sono localizzati nello strato ependimale o periependimale, e devono il loro nome alla presenza di un

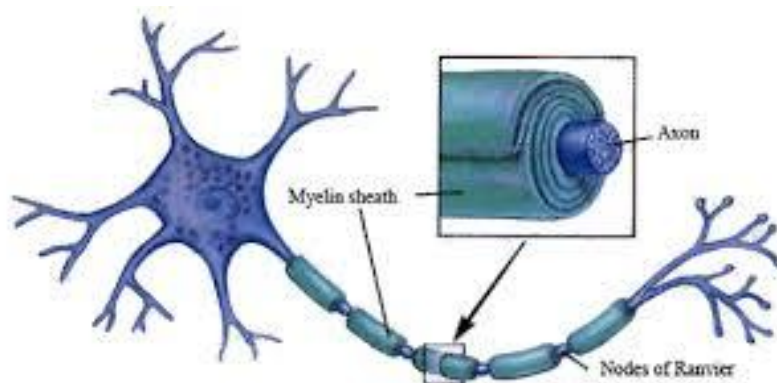


prolungamento radiale che dalla zona ventricolare raggiunge la superficie piaie, attraversando tutto lo spessore del tubo neurale, dove forma la glia limitans. Le cellule della glia radiale sembrano avere specifiche funzioni durante lo sviluppo, formando un ponte per la migrazione neuronale (Rakic, 1972; Levitt and Rakic, 1980). Di preciso, durante il primitivo sviluppo dell'encefalo la zona ventricolare dà due tipi di cellule: la glia radiale ed i neuroni. Il meccanismo di migrazione dei neuroni è semplice: la glia radiale manda dei lunghi prolungamenti verso la superficie esterna, piaie, dell'encefalo e i neuroni in sviluppo migrano lungo questi prolungamenti gliali. In questa fase "immatura" le cellule della glia radiale esprimono la Vimentina come proteina citoscheletrica principale, che sarà sostituita successivamente dalla GFAP (Voigt, 1989). Nel sistema nervoso centrale di *Danio rerio* sono stati comunque descritti (Kaway et al., 2001), a livello della corda spinale, cellule dalla forma stellata simil astrocitaria che prendono contatto con i vasi sanguigni e la superficie piaie della corda. Inoltre sono stati descritti anche astrociti reticolari con caratteristiche di cellule epiteliali, comuni nei nervi ottici (Maggs and Scholes, 1990). A differenza di quanto accade nei mammiferi nei quali i canali di acquaporina-4 sono localizzati nei processi astrocitari intorno ai vasi sanguigni e la superficie piaie, in *Danio rerio* l'acquaporina-4 è distribuita in tutta la lunghezza delle fibre della glia radiale e non sono concentrate nei peduncoli terminali (Grupp et al., 2010). La glia radiale di *Danio rerio* condivide alcune caratteristiche con gli astrociti dei mammiferi, indicando che la glia radiale provvede ad alcune funzioni astrocitarie di base nei vertebrati non mammiferi.

3.2.2 Componente mielinica

La mielina è una membrana multistrato, costituita dall'avvolgimento di cellule gliali intorno agli assoni, che permette la conduzione efficiente dei potenziali d'azione nel sistema nervoso dei vertebrati (Sherman and Brophy, 2005; Nave and Trapp, 2008).

La guaina mielinica funge da isolante e presenta interruzioni ad intervalli regolari (nodi di Ranvier) che generano gli impulsi nervosi. Il tipo di conduzione elettrica che avviene lungo le fibre mielinizzate è detta saltatoria ed è più rapida rispetto alle fibre amieliniche.



Cellula nervosa rivestita da guaina mielinica

I principali costituenti della mielina in *Danio rerio* sono la *myelin protein zero* (MPZ), la proteina proteolipidica (PLP1) e la proteina basica della mielina (MBP).

La MPZ è una glicoproteina appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline costitutivamente espressa nel SNC e SNP dei pesci (Yoshida e Colman, 1996) mentre nei mammiferi è espressa solo nel SNP. L'isoforma più abbondante nel SNC di *Danio rerio* è una proteina di 23,5 kDa contenente una porzione di carboidrati di 3kDa che viene persa in seguito a maturazione generando un P0 maturo di 186 amminoacidi e peso molecolare 20,5 kDa. MPZ mostra un pattern di espressione caratteristico durante lo sviluppo. L' mRNA di MPZ è espresso nei rombomeri del rombencefalo già a 16-24 ore dopo la fecondazione in accordo con la crescita assonale. Tra le 48 e le 96 ore dopo la fecondazione, una più marcata espressione dell' mRNA si manifesta negli oligodendrociti del rombencefalo in via di sviluppo, oltre che nel mesencefalo e nel midollo spinale indicando l'inizio della mielinizzazione. A 5-6 giorni l'mRNA di MPZ si espande rostralmente, caudalmente e lateralmente; tra le 4-6 settimane si esprime considerevolmente a livello della sostanza bianca di rombencefalo, nervo, tratto e tetto ottico, tronco cerebrale e midollo spinale. MPZ è espresso essenzialmente negli oligodendrociti; tessuti al di fuori del sistema nervoso come pelle, muscoli o intestino, non esprimono questa proteina. La trascrizione del gene *mpz* avviene nel citoplasma degli oligodendrociti e non oltre distalmente nella cellula, mentre la proteina si rileva solo nelle guaine mieliniche. Questo si può attribuire alla presenza di meccanismi post trascrizionali, come proteine trasportatrici che

trasferiscono MPZ matura al sito di formazione della mielina o di un meccanismo che la degrada quando non associata alla guaina mielinica (Brösamle e Halpern, 2002; Schweitzer et al., 2003; Bai et al., 2007). MPZ facilita l'adesione tra membrane mieliniche adiacenti tramite interazioni omofile permettendo la formazione di mielina compatta. Inoltre in *Danio rerio*, questa proteina media la rigenerazione assonale e la rimielinizzazione a seguito di un danno del nervo ottico, favorendo il ripristino della funzione visiva (rivisto da Becker e Becker, 2007).

MBP, come suggerisce il nome, ha un'alta percentuale di residui basici e la sua forte carica positiva indica che contribuisce al compattamento della mielina, con la proteina MPZ. Viene rilevata 2 giorni dopo la fecondazione, inizialmente nel rombencefalo ventrale e successivamente nel mesencefalo, nel nervo ottico e nel midollo spinale. Gli mRNA codificanti per MBP sono localizzati nei processi degli oligodendrociti mielinizzanti. La corretta localizzazione degli mRNA è garantita da proteine motrici della superfamiglia delle kinesine come KIF1B. Mutazioni in questi geni causano difetti di localizzazione con la conseguente formazione di mielina compatta ectopica. MBP è di notevole interesse in quanto è il maggiore auto antigene nella sclerosi multipla.

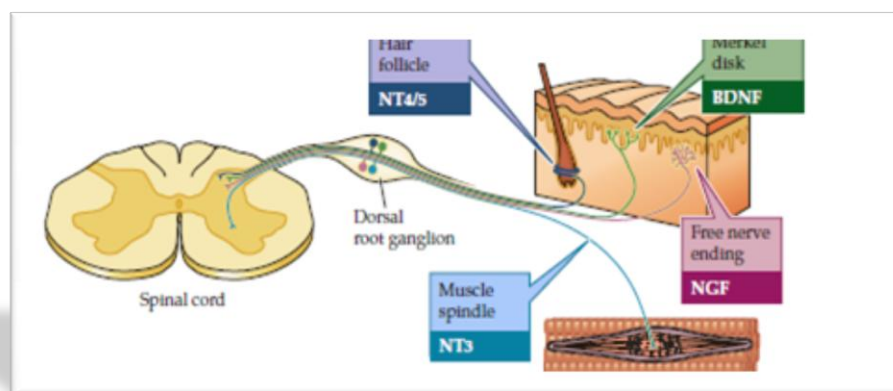
Le proteine proteolipidiche della mielina, PLP e DM-20 sono costituenti caratteristici altamente abbondanti (30% del totale delle proteine) della mielina del SNC dei tetrapodi. DM-20 è una proteina che deriva dallo splicing alternativo dell'mRNA

di PLP. La sequenza proteica di PLP differisce da quella di DM-20 per l'inserzione di trentacinque amminoacidi. *Danio rerio* esprime quattro ortologi di DM-20, tre dei quali derivano dallo splicing alternativo di un singolo gene e sono DM α , DM β e DM γ . DM α 2 inizia l'espressione negli oligodendrociti nello stesso momento di P0 e come per quest'ultimo, si trova solo negli oligodendrociti e non nelle cellule di Schwann (Brosamle and Halpern, 2002). La proteina DM α ha una sequenza primaria altamente omologa al polipeptide DM-20 dei mammiferi. DM α /DM-20 hanno una somiglianza significativa ai canali ligando-dipendenti nelle regioni dei domini che formano pori (Kitagawa et al., 1993) e sono co-espressi negli oligodendrociti e nelle cellule di Schwann e co-localizzati nella mielina compatta. Sulla base di questi dati è stato suggerito che la proteina avesse inizialmente proprietà di formazione di canali o pori e che nel corso dell'evoluzione abbia acquisito proprietà di adesione della membrana.

Altri componenti della guaina mielinica sono la proteina di 36kDa (36 K) appartenente alla famiglia delle deidrogenasi/reduttasi a catena corta; la claudina K presente negli assoni delle cellule che producono la mielina e i cui livelli si riducono in seguito a danno del nervo ottico per poi aumentare dopo 14-28 giorni dalla lesione.

3.3 Signalling neurotrofico e la famiglia delle neurotrofine

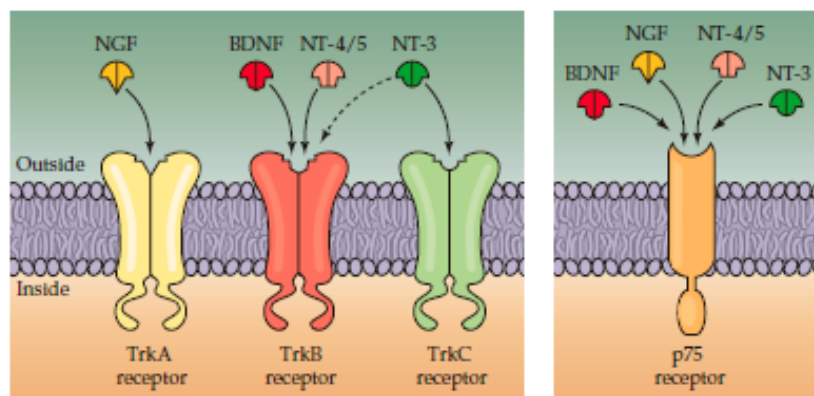
Le tre maggiori funzioni del signalling neurotrofico - sopravvivenza di una parte delle cellule nervose da una popolazione più grande, susseguente formazione e mantenimento di un appropriato numero di connessioni, ed elaborazione dei prolungamenti dendritici ed assonali per supportare queste connessioni, possono essere razionalizzate in parte mediante la disponibilità dei fattori trofici. Queste regole comportano diverse assunzioni generali su i neuroni e i loro target (altri neuroni, muscoli, strutture periferiche). Per prima cosa i neuroni dipendono dalla disponibilità di quantità minime di alcuni fattori trofici per la sopravvivenza, e di conseguenza per la persistenza di un appropriato numero di connessioni target. Secondo, i tessuti target sintetizzano e rendono disponibili ai neuroni in via di sviluppo i fattori trofici appropriati. Terzo, i target producono fattori neurotrofici in quantità limitate; di conseguenza la sopravvivenza dei neuroni in via di sviluppo dipende dalla competizione nervosa per i fattori disponibili.



Influenza specifica delle neurotrofine in vivo (Purves et al., 2004, Neuroscience)

Molti dei fattori neurotrofici fanno parte di una di queste tre famiglie: la famiglia delle neurotrofine, la famiglia delle citochine neuropoietiche e i ligandi della famiglia dei glial cell line derived neurotrophic factor. Ad oggi si conoscono 4 appartenenti alla famiglia delle neurotrofine: il nerve growth factor (NGF), il brain derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3(NT-3) e neurotrophin-4/5 (NT-4/5). Anche se diverse neurotrofine sono omologhe per la struttura e la sequenza amminoacidica, queste sono molto diverse per la loro specificità. Per esempio, l'NGF supporta la sopravvivenza dei neuroni simpatici, mentre un altro membro della famiglia, BDNF, non fa lo stesso. Viceversa, il BDNF, ma non l'NGF, supporta la sopravvivenza di certi gangli nervosi sensoriali, i quali hanno diversa derivazione embrionale. NT-3 invece supporta entrambe queste popolazioni. Tutte le osservazioni biologiche effettuate sulle interazioni neurotrofiche suggeriscono che il signaling mediato dalle neurotrofine attiva tre differenti tipi di risposte: sopravvivenza/morte, stabilizzazione/eliminazione delle sinapsi, crescita/retrazione dei processi (Campenot 1981). Quindi c'è un elevato livello di selettività per l'azione delle neurotrofine, dipendente dai fattori neurotrofici disponibili, lo stadio di differenziamento del neurone rispondente così come i domini cellulari dove i signaling neurotrofici prendono posto. Le azioni selettive delle neurotrofine derivano dalla loro interazione con due classi di recettori: i recettori Trk (tirosin kinasi) e il recettore p75. Ci sono tre recettori Trk, ognuno dei quali è un proteina a singolo segmento trans membrana con

un dominio citoplasmatico tirosin kinasi. Trk A è il recettore di NGF, Trk B di BDNF e NT-4/5, mentre Trk C il recettore di NT-3. In aggiunta, tutte le neurotrofine hanno la capacità di attivare il recettore proteico p75. L'interazione tra le neurotrofine e p75 dimostra un altro livello di selettività e specificità del signaling delle neurotrofine. Tutte le neurotrofine sono secrete in una forma non processata che è soggetta poi a clivaggio proteolitico. Il recettore p75 presenta alta affinità per le neurotrofine non processate e bassa affinità per le molecole processate mentre per i recettori Trk abbiamo la situazione inversa. L'espressione di un particolare sottotipo di recettore Trk o p75 conferisce quindi la capacità di rispondere alla corrispondente neurotrofina.



Recettori delle neurotrofine e relativa specificità (Purves et al., 2004, Neuroscience)

Capitolo 4

Scopo della Ricerca

Lo scopo della presente ricerca è quello di caratterizzare il danno esercitato dal cadmio a carico del sistema nervoso centrale, monitorando la risposta dei diversi tipi cellulari gliali e nervosi coinvolti, verificando l'innescò di fenomeni tipici di malattie neurodegenerative. La maggior parte delle informazioni finora raccolte sulla natura di fattore di rischio del Cd per lo sviluppo di malattie neurodegenerative, poggia su analisi post mortem ed esperimenti in vitro. Per una maggiore comprensione della neurotossicità, da inquadrare in un complesso network di fattori come quello di un sistema in vivo, risulta quindi fondamentale avvalersi di un modello animale. Il modello scelto è il pesce teleosteo *Danio rerio* che essendo un vertebrato, presenta una complessa istologia del sistema nervoso centrale caratterizzata dalla presenza di numerosi tipi cellulari nervosi e gliali con le relative reti interattive, che risultano però semplificate rispetto ad un mammifero, portando così ad una facilitazione della comprensione dei meccanismi biologici da decifrare. Lo studio è stato articolato su livelli differenti, integrando diverse metodologie, come l'analisi istologica, istochimica, ed immunoistochimica, saggi di permeabilità, tecniche biochimiche come il western blotting e di biologia molecolare come la Rt-PCR per determinare possibili differenze nell'espressione di molecole target. I marcatori scelti sono: la GFAP, per le cellule della neuroglia; il peptide β -amiloide da 42 residui amminoacidici per verificare un'alterazione del metabolismo di tale peptide; la glutammato deidrogenasi, enzima chiave nelle reazioni anaplerotiche implicate nella produzione di neurotrasmettitori; il BDNF neurotrofina importante per la sopravvivenza dei neuroni e l'interleuchina 1β per verificare processi infiammatori indotti.

Capitolo 5

Materiali e Metodi

5.1 Stabulazione dei pesci

La mia esperienza di laboratorio è iniziata con l'allestimento delle vasche per la stabulazione e l'allevamento degli esemplari di *Danio rerio*. Generalmente i pesci vengono allevati in laboratorio in acquari da 20L, in cui vengono inseriti circa 20 individui tra maschi e femmine in rapporto di tre femmine per un maschio. Riserve d'acqua, proveniente da un impianto ad osmosi sono a disposizione giornalmente per il ricambio d'acqua in ciascun acquario. Nel mantenimento di questi ciprinidi vengono osservate le disposizioni dettate da (Westerfield, 1995) ovvero l'acqua deve essere mantenuta ad una temperatura di 28°C, il suo pH deve essere mantenuto attorno alla neutralità (Westerfield, 1995); non deve essere presente cloro e i nitrati non devono superare il valore di 30mg/L. L'Acqua deve presentare una composizione salina adeguata alle esigenze dei pesci (CaSO₄, NaHCO₃, Instant Ocean) (Westerfield, 1995).

5.2 Raccolta delle uova

La sera precedente la raccolta delle uova, biglie di vetro sono state poste sul fondo dell'acquario. Questa strategia viene adottata al fine di impedire ai pesci adulti di cibarsi delle loro stesse uova, dal momento che queste ultime rimangono intrappolate tra le biglie. Il mattino seguente le uova sono state raccolte mediante l'uso di un sifone e trasferite in una vasca trasparente da cui sono state successivamente prelevate con una pipetta Pasteur di plastica e trasferite in un becher con la soluzione di allevamento.

5.2.1 Allevamento di embrioni

Embrioni e larve di *Danio rerio* sono stati allevati in un bagnetto termostato a 28° C, all'interno di becher di vetro contenenti una soluzione (Egg solution) preparata diluendo 1,5 mL di stock in 1L di BDW. La soluzione stock a sua volta è stata preparata solubilizzando 40 gr di Instant Ocean in 1L di BDW, sterilizzata e conservata in frigo a 4° C.

5.2.2 Test di tossicità in vivo

Per la valutazione della tossicità sullo sviluppo di *Danio rerio* correlata al cadmio, sono stati effettuati test di tossicità in vivo su embrioni e larve del piccolo ciprinide, sottoposti a trattamento con il sale CdCl_2 .

5.2.3 Selezione delle uova

Per i test di tossicità sugli embrioni è occorsa una fase preliminare di selezione per distinguere le uova sane da quelle non fertilizzate o da uova che esibiscono ovvie irregolarità, come la formazione di vescicole, asimmetrie di vario genere o la presenza di un corion difettoso. Per la selezione, effettuata a circa 4,30 h dalla fecondazione, le uova sono state poste in una piastra petri contenente la soluzione di allevamento ed analizzate successivamente allo stereomicroscopio (ingrandimento 30x). Questa analisi ci ha consentito di selezionare embrioni sani e sincronizzati, ovvero embrioni che si trovano esattamente nella stessa fase dello sviluppo.

5.2.4 Trattamento di embrioni con CdCl₂

Embrioni di 6hpf e larve di 5dpf (separatamente) sono stati esposti al Cd, sottoforma di cloruro di cadmio (CdCl₂). Per il trattamento acuto in vivo si è provveduto a preparare una soluzione stock 50mM di CdCl₂, solubilizzando 2,51 gr del sale in 250 ml di soluzione di allevamento. Da quest' ultima sono state ottenute, per diluizioni seriali, tutta una serie di soluzioni a concentrazioni più basse. Per ogni test sono stati utilizzati 30 embrioni/larve per punto sperimentale, più 30 controlli esposti semplicemente alla soluzione di allevamento. I trattamenti sono stati condotti all' interno di piastre multi-pozzetto (con un numero di embrioni/larve per pozzetto pari a 10), incubate a 28° C, provvedendo due volte al giorno al rinnovo delle soluzioni.

5.2.5 Osservazione in vivo

A tempi determinati, e precisamente a 24 e a 48 ore è stata condotta un' analisi in vivo allo stereo-microscopio grazie alla quale è stato possibile valutare il grado di mortalità di embrioni esposti al metallo ed eventuali alterazioni fenotipiche riconducibili al Cd.

Al fine di conferire maggiore significatività ai dati ottenuti, i test sono stati ripetuti tre volte.

5.2.6 Colorazione con arancio di acridina

Embrioni di controllo ed esposti al CdCl₂ per 24 ore a partire dallo stadio di shield sono stati messi in boccettine pulite. Sono stati effettuati alcuni sciacqui con la soluzione di allevamento per allontanare i sali precipitati e i residui di Cd nella

soluzione degli embrioni trattati. Successivamente gli embrioni sono stati esposti ad una soluzione di arancio di acridina alla concentrazione di 100µg/ml per un ora. Finita l'ora sono stati effettuati degli sciacqui per allontanare l'eccesso di colorante, e dopo di che gli embrioni sono stati montati in vetrino a goccia con glicerolo e PBS. L'acquisizione della fluorescenza è stata effettuata settando il canale del FITC.

5.3 Trattamento acuto in vivo su individui adulti con CdCl₂

In particolare per il mio lavoro di tesi, per valutare la tossicità dovuta al cadmio sono stati utilizzati esemplari adulti (dai 4 ai 10 mesi d'età) di *Danio rerio*. I pesci, acquistati in attività commerciali d'acquariologia, sono stati stabulati ed acclimatati in vasche dotate di ossigenatore e termostato propri, mantenuti ad una temperatura di 28 °C con fotoperiodo naturale e nutriti con cibo commerciale. Gli esemplari adulti di *Danio rerio*, sono stati suddivisi in due vasche: una di controllo con acqua incontaminata ed una in cui è stato aggiunto cloruro di cadmio (CdCl₂) in ragione di 1,0 mg/L. Gli acquari sono stati sottoposti quotidianamente a ricambio d'acqua, e per la vasca dei trattati quotidianamente è stata rinnovata la soluzione di CdCl₂. Per valutare l'andamento dei danni, sono state scelte tre finestre temporali in cui andare a cercare le specifiche alterazioni, e precisamente a 2, 7 e 16 giorni dall'inizio del trattamento. Gli esemplari raccolti sia di controllo che trattati sono stati anestetizzati mediante MS222 (0,1 g/L), poi in ghiaccio per 5-10 minuti ed immediatamente sacrificati con taglio cervicale, per facilitare l'estrazione degli encefali. Gli encefali rapidamente rimossi dalla scatola cranica in parte sono stati fissati in fissativo di

Bouin (15mL di acido picrico, 4mL di formalina 4%, 1mL di acido acetico glaciale) in parte sono stati messi in eppendorf con TRI reagent per l'estrazione dello RNA totale e con RIPA buffer per l'estrazione delle proteine.

5.4 Allestimento dei preparati per la microscopia ottica

Trascorse le 24h di fissazione, gli encefali sono stati sottoposti ad un processo di disidratazione, in una serie crescente di etanolo; ed a chiarificazione mediante xilolo. Terminata la disidratazione segue l'inclusione allo scopo di conferire al campione la consistenza necessaria al taglio; pertanto gli encefali sono stati messi in paraffina liquida e lasciati in stufa a 56°C over-night. I campioni sono stati successivamente trasferiti in forme adatte per l'inclusione contenenti paraffina sciolta che viene fatta raffreddare e solidificare, per 24h circa, a temperatura ambiente. Una volta inclusi, i campioni sono pronti per essere montati su appositi supporti ed essere sottoposti a taglio al microtomo. Per la microscopia ottica, occorre tenere presente che il campione dovrà essere attraversato dalla luce; pertanto dovrà essere tagliato in fette estremamente sottili della dimensione di 6 micron. Il sezionamento del tessuto è stato effettuato utilizzando il microtomo a rotaia.

5.5 Colorazione Ematossilina-Eosina

Questa tecnica è una colorazione dicromica e combinata perché consiste nella colorazione del nucleo con una lacca ematossilinica basica, come l'emallume acido di

Mayer, a cui si fa seguire una colorazione citoplasmatica con un colorante acido, come l'eosina acidificata con 1-3 gocce di acido acetico per 100 ml di soluzione colorante. I nuclei appaiono viola; i territori extranucleari (citoplasma e territori interstiziali) appaiono in rosa, con varia gradazione.

Per poter colorare i preparati essi sono stati dapprima “sparaffinati” ossia è stata eliminata la resina d'inclusione mediante passaggi in xilolo; successivamente idratati attraverso dei passaggi in una scala decrescente di etanolo fino ad arrivare all'acqua bidistillata. Le sezioni sono state colorate mediante immersione per 3' in emallume acido di Mayer e 1,5' in eosina all'1%, successivamente i campioni sono stati disidratati mediante una serie crescente di alcoli, chiarificati in xilolo e montati mediante balsamo del canadà.

5.6 Colorazione con CRESYL VIOLETTO

Questa colorazione permette la differenziazione tra neuroni e cellule gliali. Si procede dapprima alla sparaffinatura e idratazione delle sezioni secondo una serie a gradazione decrescente di alcol fino ad arrivare all'acqua bi distillata.

Successivamente le sezioni di encefalo sono immerse nella Working solution per 20 minuti. La Working solution è preparata a partire da 1 mL di Stock solution in 100 mL di Buffer solution. La Stock solution contiene 2 g di cresyl-violet in 100 mL di acqua distillata; la Buffer solution è composta da 2 g di acetato di sodio in 1 L d'acqua e con l'aggiunta di 3 mL di acido acetico glaciale.

Avvenuta la colorazione, le sezioni vengono immerse in acqua di fonte per 10 minuti e brevemente sciacquate in acqua distillata; successivamente disidratate nella serie ascendente degli alcoli e chiarificate con xilolo. La glia appare di colore viola chiaro mentre i neuroni appaiono colorati in viola scuro.

5.7 Colorazione istochimica con fluorojade C

Il FluoroJade C è un fluorocromo anionico derivato dalla fluoresceina, ed è comunemente usato nelle neuroscienze per rivelare la degenerazione dei neuroni nel sistema nervoso centrale risultante dall'esposizione ad una varietà di insulti neurotossici nel nostro caso derivati dall'esposizione al cadmio.

Le sezioni degli encefali di controllo e dei trattati sono state sparaffinate in xilolo e reidratate in una serie decrescente di gradazione di etanolo fino ad arrivare all'acqua bi distillata. In seguito le sezioni sono state incubate per 10 minuti in permanganato di potassio 0.06%. Segue l'incubazione delle sezioni in Fluorojade C per 10 minuti al buio. I vetrini vengono fatti po asciugare all'aria su piastra termostata a 50°-60°C per 5 minuti, chiarificati mediante xilolo e montati.

5.8 Colorazione con Methasol Fast Blue (MFB)

Questo metodo fornisce una colorazione molto soddisfacente della mielina consentendo di rilevare demielinizzazioni nel sistema nervoso centrale. Il colorante è

composto da ftalocianine rameiche solfonate solubili in alcool, attratte da basi che si trovano nelle lipoproteine della guaina mielinica; sembrano formare un complesso molto stabile con i fosfolipidi contenenti colina.

I preparati sono stati dapprima “sparaaffinati” e successivamente reidratati attraverso dei passaggi in una scala decrescente di gradazione di etanolo fino ad arrivare in acqua distillata.

Una volta che le sezioni sono portate all’acqua è possibile colorarle immergendole in una vaschetta contenente methasol fast blue (precedentemente ricoperta con carta di alluminio) e posta in stufa a 58° per 2 ore. Per eliminare eccesso di colorante, ovvero le molecole che non si sono legate o che si sono legate aspecificamente, si effettuano i seguenti passaggi in etanolo a 95°, in acqua distillata e poi nella soluzione di carbonato di litio 0,05% per 15 secondi ed infine altri 15 secondi in alcol 75° con passaggio in acqua distillata. Questo processo detto di “differenziamento” viene compiuto controllando il livello di colorazione raggiunto della sezione e di ripeterlo se dovesse essere scuro a partite dal carbonato di litio. Successivamente i vetrini vengono posti in emallume per 30 secondi per il contrasto dei nuclei. Le sezioni vengono infine disidratate in una serie crescente di etanolo, chiarificate mediante xilolo e montate mediante balsamo del canadà.

5.9 Analisi immunoistochimica con metodo ABC

L'utilità del metodo immunoistochimico indiretto sta principalmente nella possibilità che all'anticorpo primario si leghino più molecole di anticorpo secondario marcato, incrementando il segnale e quindi migliorando la rivelazione dell'antigene. Nel mio lavoro ho effettuato l'analisi immunoistochimica indiretta ed amplificata con il metodo ABC (Vectastain Abc Kit, Vector Laboratoires, inc, Burlingame CA). Il metodo ABC consiste nell'utilizzare un anticorpo secondario marcato con una molecola di biotina. La biotina è riconosciuta da una molecola di avidina che possiede quattro siti di legame per la biotina, di cui tre occupati ed uno libero per il riconoscimento della biotina coniugata all'anticorpo secondario. Il labelling utilizzato per le tre molecole di biotina legate alla molecola di avidina è la perossidasi per cui il mezzo di rivelazione è la DAB (diaminobenzidina). La tecnica prevede la sparaffinatura delle sezioni in xilolo ed idratazione delle stesse mediante l'uso di una serie di alcoli a concentrazione decrescente, fino ad acqua distillata, per poi arrivare alla inibizione delle perossidasi endogene mediante incubazione per 10' in acqua ossigenata al 3%. Dopo il lavaggio delle sezioni con acqua bidistillata è stato effettuato lo smascheramento degli antigeni mediante incubazione con la proteinasi K per 10' a 37°C. Incubazione delle sezioni a 4°C in camera umida over-night, con i seguenti anticorpi Policlonali: anti-GFAP (Dako z0334) diluito 1:300 in PBS; anti-GLUD1(sab100932 sigma-aldrich) diluito 1:300 in PBS; anti-peptide β -Amiloide (ab39377) diluito 1:300 in PBS; anti-IL 1 β (ab2105) diluito 1:100 in PBS; anti-NGF

diluito 1:50 in PBS; anti-BDNF (mAB248 R&D Systems) diluito 1:50 in PBS. Dopo aver rimosso l'anticorpo primario si procede con l'Incubazione delle sezioni con anticorpo secondario biotinilato. Successivamente si effettua un trattamento per 45' con il complesso rivelatore ABC. Viene poi effettuata la rivelazione con la DAB più alcune gocce di H₂O₂ al 3% per un tempo variabile che va dai 3 ai 6 minuti correlato all'affinità relativa tra gli anticorpi e l'anticorpo primario e il suo antigene. Il controllo negativo è stato eseguito omettendo l'uso dell'anticorpo primario.

5.10 Saggio di permeabilità della BEE alla perossidasi di rafano

Gli esemplari di *Danio rerio* esposti per 16 giorni al CdCl₂ e non esposti al metallo, venivano prelevati dall'acquario uno alla volta ed anestetizzati mediante immersione in una soluzione contenente MS222 allo 0,1% per 5 minuti. A questo punto venivano iniettati nella vena caudale dei pesci 50µl di una soluzione di perossidasi di rafano mediante l'utilizzo di siringhe da 0,3ml 30G x 8mm. Gli esemplari utilizzati come controllo negativo dell'esperimento venivano invece iniettati con 50 µl di PBS. Dopodiché i piccoli ciprinidi venivano messi in una vasca di recupero in attesa che si risvegliassero. Al loro risveglio venivano anestetizzati con MS222 allo 0,1% per 5 minuti e poi subivano un taglio cervicale per poter estrarre l'encefalo. Gli encefali, estratti sono stati fissati mediante immersione nella miscela di Bouin per 48 ore .

La metodica di rilevazione delle perossidasi mediante saggio isto-enzimatico consisteva nell'esporre le sezioni seriali di 5µm degli encefali dei pesci esposti al cadmio per 16 giorni e i pesci non esposti ad un substrato delle per ossidasi, la diaminobenzidina più acqua ossigenata, con la finalità di osservare possibili differenze nell'intensità del segnale nel parenchima cerebrale, indice di una differente permeabilità della BEE. I campioni sono stati sparaffinati e reidratati mediante immersione in xilolo e una serie decrescente di concentrazione di etanolo, fino ad arrivare all'acqua bidistillata. A questo punto è stata effettuata una incubazione con 3 mg of 3,3 '-diaminobenzidina-tetraidrocloreuro (Sigma, USA) in 10 ml di PBS + 150 µl di H₂O₂ al 3%. Blocco della rilevazione delle perossidasi mediante acqua distillata con successivi sciacqui in PBS. Le sezioni sono state poi contrastate mediante una breve esposizione in emallume acido di Mayer per la rilevazione dei nuclei. Disidratazione e chiarificazione delle sezioni sono state effettuate attraverso passaggi in una serie di etanolo di concentrazione crescente e xilolo. Montaggio con balsamo del Canada.

5.11 Analisi Biochimica

L'analisi biochimica per verificare l'eventuale alterazione di specifiche proteine è stata condotta attraverso Western blotting.

5.11.1 Quantizzazione delle proteine: Saggio Pierce

Per quantificare gli estratti cellulari è stato utilizzato il BCA Protein Assay kit (Pierce) che sfrutta il metodo colorimetrico dell'Acido Bicinconinico. Le soluzioni A (Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Tartrato di Sodio, Acido Bicinconinico in una soluzione 0,1M di NaOH) e B (soluzione al 4% di Cu_2SO_4) sono state miscelate in proporzione 50:1 rispettivamente per un volume finale di 2.04 ml. Per ottenere una quantizzazione più precisa, è necessario fare riferimento alla retta di taratura ottenuta misurando, oltre a quella dei nostri campioni, anche l'assorbanza di una diluizione seriale di campioni a concentrazione nota di albumina di siero bovino (BSA). Standard e campioni sono stati aggiunti alla miscela di reattivi A+B e dopo agitazione per 30 secondi sono stati incubati per 30 minuti a 37°C. La lettura spettrofotometrica è stata eseguita alla lunghezza d'onda di 562nm. Prima è necessario tarare lo strumento mediante una cuvetta contenente il "bianco" (livello di background).

5.11.2 Analisi delle proteine mediante Western blotting

Il western blot o immunoblotting è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine e valutare quanto essa è espressa.

Corsa elettroforetica su gel

L'elettroforesi è un metodo di separazione eccellente per macromolecole ed in particolare per proteine e acidi nucleici. In questo caso la separazione proteica avviene mediante SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis).

% Acrilam.	10% Running gel	5% Stacking gel
	V_f 10 ml	V_f 5 ml
Acrilamide stock 40% (ml)	2.5mL	625µL
TrisHCl 1M pH 8,8 (ml)	3.74mL	-
TrisHCl 1M pH 6,8 (ml)	-	325 µL
SDS 10%	100 µl	50 µl
H₂O MilliQ (ml)	3.56 ml	3.925 ml
APS 10% (µl)	100 µl	50 µl
TEMED (µl)	10 µl	5 µl

Per ciascun campione, sono stati caricati 60 µg di proteine a cui è stato precedentemente aggiunto H₂O milliQ; β- Mercaptoetanolo E LB. Dopo aver denaturato i campioni nel block heater 5' a 95°C, si inseriscono in ghiaccio per un

minuto e una volta spinnati sono pronti per il caricamento. Le camere porta-gel vengono montate sul relativo supporto in modo da creare un circuito elettrico chiuso; immersi nella tanica a cui si aggiunge Running Buffer 1x (3.03g di TRIS, 14.4g di glicina e 10g di SDS disciolti in 1L di BDW). Si possono quindi caricare i campioni ed un marcatore di peso molecolare noto.

Si chiude la tanica con il rispettivo coperchio che andrà collegato ad un generatore di corrente impostato su 100 V costanti e si fa partire la corsa.

Trasferimento su membrana PVDF

La procedura di trasferimento su filtro sotto la spinta di un campo elettrico è definita anche elettroblotting.

Il principio su cui si basa è quello di far migrare le proteine sulla membrana di nitrocellulosa elettroeluendole dal gel nella direzione dell'anodo. Si utilizza una vasca elettroforetica con elettrodi convenzionalmente di platino. In quest'ultima si inserisce un sandwich costituito da due fogli di spugna sintetica (tipo gommapiuma) che racchiudono il gel e il filtro PVDF a loro volta racchiusi da due fogli di carta 3MM. Le

due spugnette, i fogli 3MM e la membrana sono precedentemente stati equilibrati in Wet Transfer Buffer 1x (3.03g TRIS, 14.4g di glicina disciolti in 800mL di BDW a cui si aggiunge 200mL di metanolo) . Il filtro deve stare dalla parte dell'anodo e il gel dalla parte del catodo. Si applica quindi una corrente elettrica costante a 200mA per due ore a 4°C.

Terminata la corsa, si riducono le dimensioni della membrana allo stretto indispensabile tramite un apposito bisturi, eliminando le aree superflue.

Per verificare il trasferimento delle proteine dal gel alla nitrocellulosa, si immerge la membrana per circa 1 minuto in una soluzione di Rosso Ponceau (Sigma) e si lava con TBSt 0,2%. In questo modo risulterà ben visibile un chiaro bandeggio delle proteine maggiormente rappresentate. La membrana viene ulteriormente sciacquata fino alla totale scomparsa del colorante. Prima del trattamento con gli specifici anticorpi, le proteine vengono bloccate sul filtro con una soluzione di milk 10% (w/v) in TBSt in modo da saturare eventuali siti aspecifici aumentando, in tal modo, la specificità antigene-anticorpo.

Immunoblotting

Si prepara la soluzione diluendo l'anticorpo primario in tPBS milk 5% (2.5g di latte in 50 mL tPBS), secondo quanto indicato dalla casa fornitrice e si tiene la membrana in incubazione 2h a temperatura ambiente in agitazione. Dopo aver recuperato la

soluzione con l'anticorpo primario, si lava la membrana in tTBS con tre lavaggi da 10' in agitazione a temperatura ambiente. Si può quindi incubare la membrana con l'anticorpo secondario diluito 1:5000 in una soluzione tTBS milk 5% per un 1h a temperatura ambiente, tenendolo in agitazione. Dopo aver rimosso l'anticorpo secondario e lavato la membrana come in precedenza, si poggia il filtro su una superficie piana pulita e la si ricopre completamente con una miscela di ECL. L'anticorpo secondario è associato al complesso enzimatico della perossidasi (HRP) che catalizza la conversione del substrato ECL (Enhanced ChemiLuminescence) creando un reagente sensibile che emette luce (chemiluminescenza). Tale emissione di luce permette di individuare la specifica proteina riconosciuta dall'anticorpo primario e messa in evidenza dall'anticorpo secondario(Fig.14). Per individuare le modalità di espressione delle proteine Gfap, peptide β amiloide 1-42, Glud1, BDNF ed actina sono stati utilizzati 5 differenti anticorpi (anti-GFAP Dako z0334, anti $A\beta_{1-42}$ ab39377, anti-Glud1 sab100932 sigma-aldrich, anti-BDNF mAB348 R&D Systems, anti β -Actin sab 2100037 sigma-aldrich).Le condizioni sperimentali utilizzate sono le seguenti:

Anticorpo primario	Diluizione in tPBS milk 5%	Anticorpo secondario	Diluizione in tPBS milk 5%
Anti-Gfap	1:2000	Anti-rabbit	1:5000
Anti-Glud1	1:1000	Anti-rabbit	1:5000
Anti- β amiloide	1:1000	Anti-rabbit	1:5000
Anti-BDNF	1:500	Anti-rabbit	1:3000
Anti- β actina	1:1000	Anti-rabbit	1:5000

La rilevazione delle proteine è stata realizzata attraverso la reazione di chemiluminescenza, la quale può impressionare una lastra radiografica dopo esposizione al filtro. In alternativa, il segnale luminoso può essere rilevato dal chemidoc il quale, associato ad un sistema di acquisizione digitale delle immagini, permette tramite una fotocamera CCD di rilevare la luminescenza consentendo una analisi quantitativa più precisa.

5.12 Analisi dei livelli di accumulo degli mRNA

5.12.1 Estrazione dell'RNA totale

Gli encefali prelevati dalla scatola cranica degli esemplari di controllo e trattati con il cadmio dopo 2, 7 e 16 giorni dall'inizio del trattamento, sono stati immediatamente

inseriti in apposite eppendorf, riempite preventivamente di TRI reagent (Sigma). Il TRI reagent è un reagente di facile utilizzo per l'estrazione simultanea di RNA, DNA e proteine, esso consiste in un misto di guanidina tiocinato e fenolo che dissolve efficacemente DNA, RNA e proteine attraverso omogeneizzazione o lisi del tessuto campione. Gli encefali inseriti nelle eppendorf con TRI reagent vengono opportunamente "pestellati" e lasciati a temperatura ambiente per cinque minuti. Avvenuta la dissociazione dei complessi nucleoproteici si aggiunge a ciascuna eppendorf 0.2mL di cloroformio per mL di TRI reagent utilizzato, si agita vigorosamente il campione per 15 secondi e lo si lascia per 15 minuti a temperatura ambiente. Segue una centrifugazione a 12.000xg per 15 minuti a 4°C. La centrifugazione separa il campione in tre fasi: una fase organica rossa contenente le proteine, un'interfase contenente DNA ed una fase acquosa incolore contenente RNA. Si procede, quindi, con l'estrazione dell'RNA. Si trasferisce la fase acquosa di ciascun campione in una nuova eppendorf e si aggiunge 0.5mL di isopropanolo per mL di TRI reagent utilizzato. Si miscela e si lascia a temperatura ambiente per 10 minuti. Segue una centrifuga a 12.000xg per 10 mnuti a 4°C. L'RNA precipita formando un pellet sul fondo dell'eppendorf. (Contemporaneamente le eppendorf contenenti l'interfase e la fase organica vengono lasciate in ghiaccio). Rimosso il supernatante si lava il pellet di RNA aggiungendo per ciascuna eppendorf 1mL di etanolo 75° per mL di TRI reagent utilizzato. Segue una centrifugazione a 7.500xg per 5 minuti a 4°C. Dopo la centrifuga si rimuove completamente l'etanolo e si lascia asciugare il pellet di RNA

all'aria per circa 10 minuti in ghiaccio. Infine dopo aver risospeso il pellet di RNA con 40µL di acqua DEPC inattiva si può congelare a -80°C per successive analisi.

5.12.2 Quantificazione dell' RNA

La quantificazione dell'RNA è stata effettuata misurando l'assorbanza del campione a 260 nm utilizzando lo spettrofotometro Nanodrop ND-1000 della Nanodrop Technology caricando 2µl di campione per ognuna delle tre letture. Questo Spettrofotometro uv/vis per microvolumi NanoDrop Technologies utilizza microvolumi di campione, fino a 1 mL. Il NanoDrop ND-1000 permette quindi di utilizzare meno materiale per l'esperimento, inoltre, non necessita dell'uso di cuvette o capillari, perché il campione viene pipettato direttamente sulla superficie di misura. Non sono nemmeno necessarie diluizioni del campione: ciò consente di eseguire misure più rapide e in modo più semplice. Bastano infatti meno di 30 secondi per effettuare la lettura e prepararsi alla successiva.

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 1.

Campione	[] RNA tot µg/µl
C	0,66
T2	0,83
T7	0,78
T16	0,76

Tabella 1: Concentrazione dei campioni di RNA totale.

5.12.3 Verifica della integrità dell'RNA

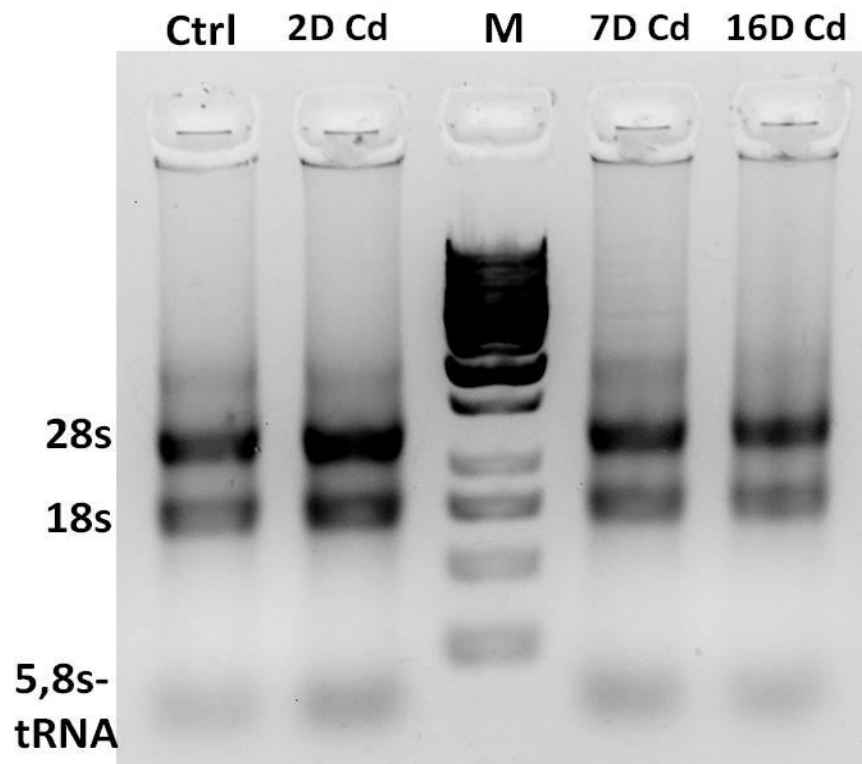
Prima di procedere con le applicazioni successive è stata verificata l'integrità dell'RNA totale estratto mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,5% con buffer TAE. Per la taratura del gel è stato utilizzato un marcatore di dimensioni note in modo da stabilire una relazione di linearità tra il logaritmo delle dimensioni del campione e la distanza percorsa. Sono stati preparati 500 ml di TAE 0,5%.

Sono stati caricati 5 μ l di ciascun campione preparati secondo quanto riportato in tabella (*Tabella 2*):

Campione	μ l Loading Buffer 5x	μ l per 1 μ g RNA tot	μ l H ₂ O Rnase-free
C	1	1,51	2,49
T ₂	1	1,20	2,80
T ₇	1	1,28	2,72
T ₁₆	1	1,31	2,69

Tabella 2: schema di caricamento degli RNA estratti e quantificati.

Alla cella è stata applicata una differenza di potenziale di 45 Volt per 30'. Terminata la corsa elettroforetica, il gel è stato osservato al trans-illuminatore ed è stato fotografato (*Figura 4.1*).



Bandeaggio ottenuto in seguito alla corsa elettroforetica in gel d'agarosio all'1,5%.

Il gel mostra che l'RNA è integro come si evince dalla presenza prevalente di bande in corrispondenza dell'RNA ribosomale 28S e 18S.

5.12.4 Retrotrascrizione

La trascrittasi inversa è una DNA polimerasi RNA dipendente che sintetizza DNA complementare (cDNA) utilizzando come stampo una molecola di RNA e forma un doppio filamento ibrido RNA-DNA. È stato utilizzato il kit EasyScript™ Reverse Transcriptase (Abm) e la reazione è stata allestita in ambiente sterile. Il kit comprende EasyScript™ RTase (200 U/μl), random primers 10 μM, dNTPs 10 mM, RT Buffer 5x. Si prepara la miscela di reazione (*Tabella 3*) con un volume finale di 15 μl caricando 1μg di RNA totale:

Campione	μl RNA tot	μl random primers (0,5μM)	μl dNTPs (500μM)	μl H ₂ O nuclease-free
C	1,51	1	1	11,49
T ₂	1,2	1	1	11,8
T ₇	1,28	1	1	11,72
T ₁₆	1,31	1	1	11,69

Tabella 3: Allestimento dei campioni per la retrotrascrizione.

In ogni campione si aggiungono 4 μl di RT buffer 5X e 1 μl di EasyScript 200 U/μl per un volume finale di 20 μl. La sintesi del cDNA avviene nel termociclatore con la seguente impostazione:

➤ 25°C x 10'

- 42°C x 50'
- 85°C x 5'
- Passaggio in ghiaccio
- Si conserva il cDNA a -20°C.

5.12.5 PCR semi-quantitativa

I livelli relativi degli mRNA dei geni mpz, plp1 e mbp presenti negli encefali degli individui trattati e di controllo sono stati ottenuti mediante esperimenti di PCR semiquantitativa. I segnali degli mRNA dei geni citati sono stati normalizzati con quelli della β -actina costitutivamente espressa nell'encefalo di *Danio rerio*. Con tale scopo ciascuno dei 4 geni è stato amplificato con una coppia di primers.

In *Tabella 4* le sequenze dei primers utilizzati.

Primer	Sequenza 5' -> 3'
Mp0 forward	GTGAAGGTTCCATTGTCTCCG
Mp0 reverse	CTGCTCTTTCTTCTCCTGGC
Plp1 forward	GTAAGACTTATGCAGCGCCC
Plp1 reverse	CTTTGTAGAGCTCCACTTCGC
Mbp forward	TCTAGGAAGCGAAGATGGCC
Mbp reverse	AGGAAGCTTTGTGTCCTCTCC
β -actina forward	GCCGGACTCATCGTACTCCTG
β -actina reverse	GTCCCTGTACGCCTCTGGTCG

Tabella 4: Sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione

5 PRIME HotMasterMix è un mix di reattivi concentrato 2.5x, pronto per l'utilizzo per esecuzione di metodi classificati come PCR "hot start". Il kit contiene tutti i reagenti necessari per eseguire la reazione a catena della polimerasi tranne primer e DNA stampo. La componente chiave del mix reattivo è l'HotMaster *Taq* DNA polimerasi, che è composto da 5 *Taq* DNA polimerasi complessate con l'inibitore HotMaster. A temperatura superiore a 55°C l'inibitore si allontana dal complesso che forma con la *Taq* DNA polimerasi in favore di specifici primer del template di DNA. Il kit 5 PRIME HotMasterMix contiene:

- HotMaster *Taq* DNA polimerasi (50U/ml) 2,5x
- HotMaster *Taq* Buffer pH 8.5 con 6,25 mM Mg(Ac)₂
- 500 µM ogni dNTP
- stabilizzatori.

I primers alla concentrazione di 10 µM erano presenti in 2 tubi distinti, uno per il reverse e uno per il forward.

Sono state preparate 3 MIX secondo il seguente protocollo:

- 0,4 µl forward (200 nM)
- 0,4 µl reverse (200 nM)

- 8 µl HotMasterMix
- 10,2 µl H₂O BDW

Per ognuno dei 3 geni sono stati allestiti 4 tubi eppendorf da 0,2 ml ciascuno così preparati:

- 19 µl HotMasterMix per ciascuna coppia di primers
- 1 µl cDNA (C, T2, T7, T16)

Con la finalità di analizzare l'amplificazione in un range esponenziale e quindi per rendere semiquantitativa l'analisi, è stato valutato poi il numero di cicli di amplificazione da utilizzare per ciascuna coppia di primers attraverso reazioni di pcr con differente numero di cicli. Il numero ottimale di cicli è risultato 35 per la β -actina, mentre sono stati effettuati 30 cicli di amplificazione per i trascritti plp1, mbp e mpz.

5.12.6 Elettroforesi su gel di agarosio

Terminata l'amplificazione, è stata allestita una corsa elettroforetica utilizzando il medesimo protocollo seguito nella verifica dell'integrità.

Il contenuto di ciascun tubo eppendorf è stato caricato in un pozzetto ed è stata impostata la corsa elettroforetica a 50 Volt per 25'. Al termine della corsa il gel è stato prelevato per l'osservazione al trans-illuminatore e fotografato.

5.13 Realizzazione delle immagini

Le immagini di microscopia ottica contenute nel presente lavoro sono state realizzate presso il Dipartimento di Biologia, mediante l'analizzatore di immagine Kontron Elektronik Imaging System KS300 (Zeiss) ed elaborate tramite il programma Adobe Photoshop 3.0.

5.14 Analisi statistica

La significatività delle variazioni riscontrate tra i campioni trattati con il Cd rispetto ai controlli riportate in questo lavoro per le diverse procedure sperimentali è stata valutata mediante il software Graphpad Prism 5, effettuando l'analisi della varianza ANOVA one way (p value impostato=0,05) con post test di Tukey.

Capitolo 6

Risultati

6.1 Mortalità ed alterazioni fenotipiche degli embrioni

Oltre a consentire la valutazione della teratogenicità e della tossicità, i test in vivo sugli embrioni a partire dalla stadio di shield sono stati eseguiti allo scopo di determinare le concentrazioni di CdCl_2 alle quali fosse possibile osservare degli effetti sub-letali. Si è fatta attenzione ovviamente alla mortalità ed alle alterazioni indotte dalla concentrazione di 1 mg/L ($9\mu\text{M}$), a causa della sua rilevanza ecotossicologica e a causa degli esperimenti condotti sugli individui adulti.

Come descritto in “Materiali e metodi”, embrioni di 6 hpf sono stati esposti a concentrazioni crescenti di una soluzione di CdCl_2 per una durata complessiva di 48 ore. A distanza di 24 e 48 ore è stata condotta un’analisi allo scopo di valutare la mortalità, espressa come il numero di morti sul totale degli esposti, ed il fenotipo degli organismi trattati.

Come riportato nel seguente grafico, dopo 24 ore di esposizione, la LC100 (Lethal Concentration 100), ovvero la concentrazione minima di CdCl_2 che determinava il 100% di mortalità, è risultata essere pari a $1000\mu\text{M}$, mentre la mortalità indotta dalla concentrazione di $9\mu\text{M}$ è risultata di circa il 10%.

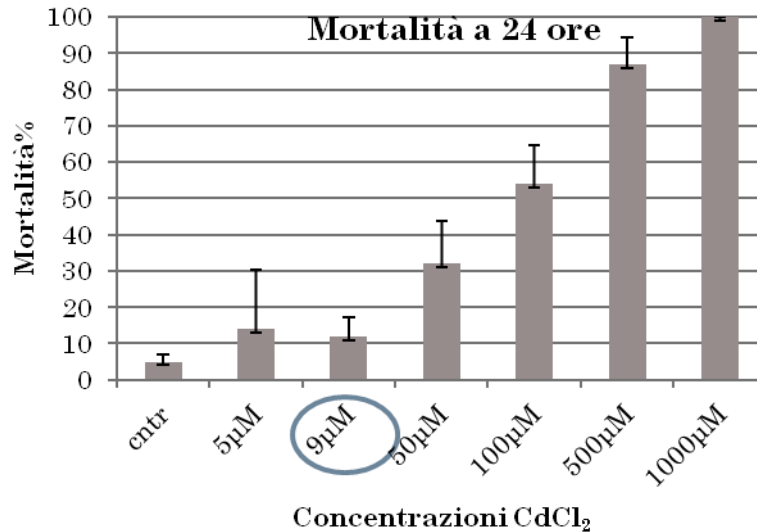


Grafico 1: Mortalità media percentuale riportata per gli embrioni esposti a CdCl₂ a partire dalla fase di shield per 24 ore. Cerchiata la concentrazione di 9µM, utilizzata anche negli esperimenti sugli adulti.

Nel grafico successivo sono riportati i valori di mortalità ottenuti dopo 48 ore di esposizione su embrioni con la LC100 scesa a 500µM, con il 40% della letalità indotta dalla concentrazione 9µM.

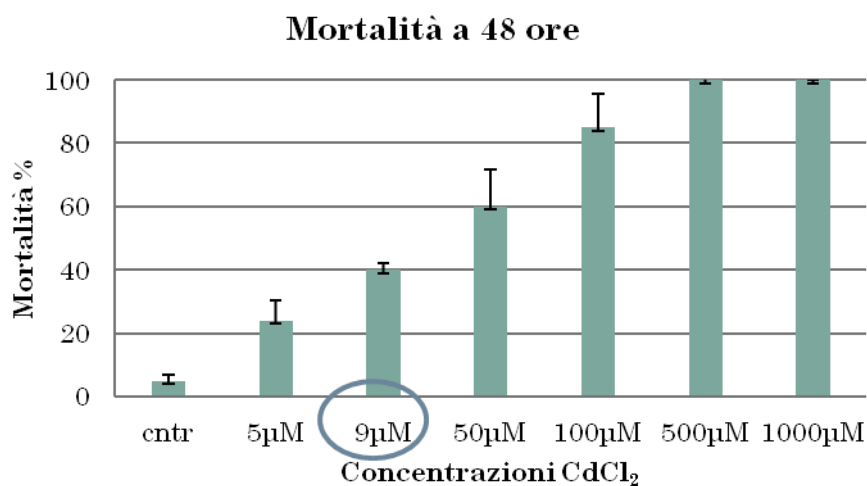


Grafico 2: Mortalità media percentuale riportata per gli embrioni esposti a CdCl₂ a partire dalla fase di shield per 48 ore. Cerchiata la concentrazione di 9µM, utilizzata anche negli esperimenti sugli adulti.

Da un'analisi fenotipica in vivo è stato possibile apprezzare diverse alterazioni morfologiche a carico di embrioni esposti a concentrazione di $9\mu\text{M CdCl}_2$, rispetto ai controlli che non manifestavano questo tipo di anomalie. In particolare sono state osservate:

- Alterazioni a livello della coda (Fig.1, A);
- Alterazioni dell'asse corporeo (Fig.1, B);
- Comparsa di edema a livello pericardico (Fig.1, C);
- Ipopigmentazione (Fig.1, D).

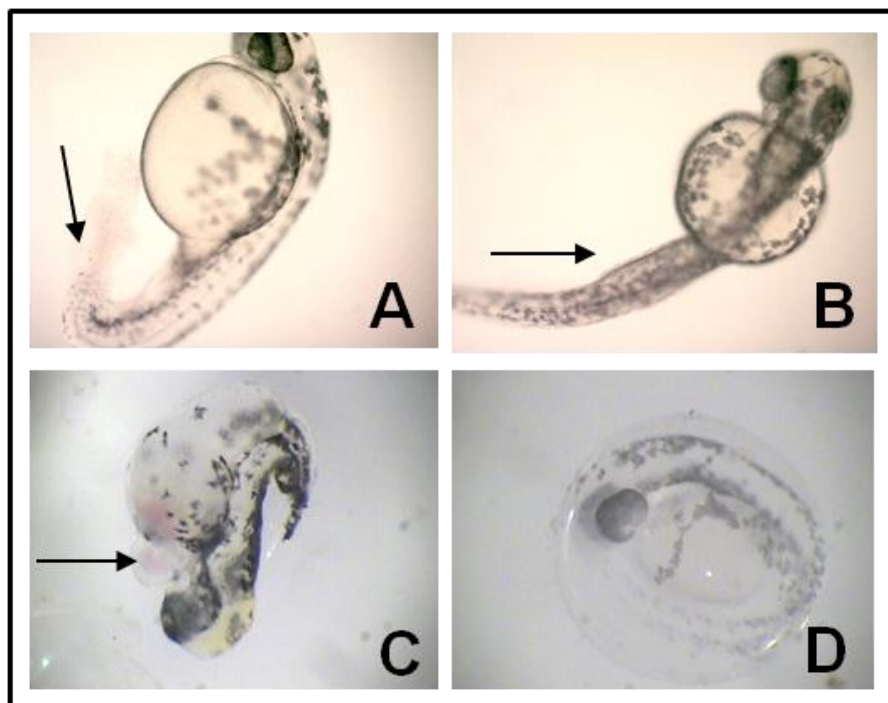


Figura 1. **A:** Alterazioni a carico della coda; **B:** Alterazioni dell'asse corporeo;
C: Edema pericardico; **D:** Ipopigmentazione

6.2 Valutazione della apoptosi indotta nell'encefalo degli embrioni

A causa della notevole mortalità (40%) indotta dopo 48 ore di esposizione gli embrioni allo stadio di shield (6 hpf a 28.5C°) esposti e non ad una soluzione di CdCl₂ 1mg/L (9μM) per 24 ore sono stati poi immersi in una soluzione di arancio di acridina per la rivelazione delle cellule in apoptosi. Sono state effettuate conte delle cellule risultate positive alla colorazione nell'encefalo di 50 embrioni in via di sviluppo di controllo ed esposti al metallo e quanto emerso è stato un aumento di 3 volte (grafico 3) del numero delle cellule apoptotiche nell'encefalo degli embrioni esposti. E' stato interessante notare un aumento del numero delle cellule fluorescenti in tutte le aree dell'encefalo (Fig.2, A e B).

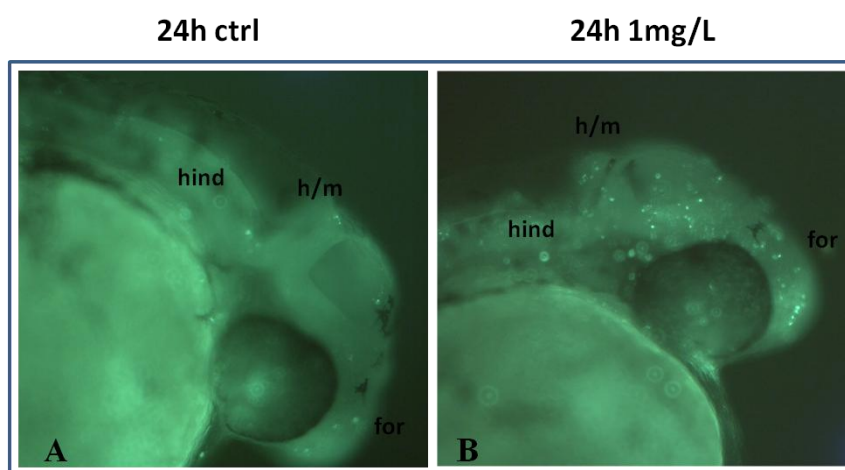


Figura 2. **A:** embrione di controllo esposto all'arancio di acridina **B:** embrione trattato per 24 ore con 1mg/L di CdCl₂ esposto all'arancio di acridina. (hind) hindbrain; (h/m) boundary hinbrain/midbrain; (for) forebrain.

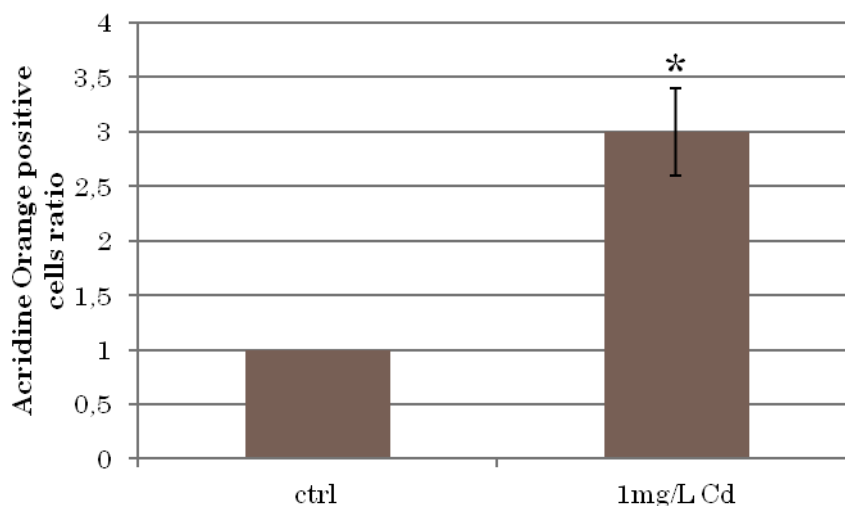


Grafico 3: Rapporto tra il numero medio di cellule positive alla fluorescenza nell'encefalo degli embrioni trattati rispetto a quelli di controllo. * $p < 0,01$

6.3 Analisi della tossicità del cadmio su individui adulti

6.3.1 Osservazioni visive

I pesci di controllo nuotavano normalmente senza nessun segno di anormalità, mentre qualche trattato esibiva un nuoto incostante. In generale tra i trattati si osservava uno stato d'irritabilità con aumento della velocità di nuoto. Inoltre verso la fine del trattamento i pesci mostravano iperventilazione ed inappetenza.

6.3.2 Indagini isto-morfologiche

Nell'encefalo del teleosteo *Danio rerio* l'analisi isto-morfologica ha rivelato che il Cd induce effetti neurotossici negli animali trattati rispetto ai non trattati.

L'encefalo di *Danio rerio* si caratterizza, al pari d'altri pesci teleostei, da una struttura che già macroscopicamente mostra una discreta lobulazione delle varie componenti. Presenta un telencefalo ben sviluppato a cui si antepongono i lobi olfattivi e a cui segue il diencefalo e il romboencefalo. Una particolarità distintiva presente in questo modello, come in tutti i teleostei, è la presenza di un telencefalo costituito da due solidi emisferi separati da un ventricolo mediale che si estendono in senso dorso laterale, come risultato di un particolare evento morfogenetico chiamato “eversione” (Liem et al., 2002).

Nei campioni di controllo il tessuto appariva omogeneo con cellule aventi struttura compatta e contorni ben definiti (Fig.3, A-C). Al contrario, i campioni trattati dopo 7 giorni (Fig.3, D) presentavano superficie ependimale irregolare, a livello dei ventricoli e del tetto ottico, con cellule dislocate differentemente; mentre più internamente si notavano spazi intercellulari di differente ampiezza. Anche nel midollo si notava una rilevante disorganizzazione tissutale, a differenza del controllo in cui gli elementi cellulari erano ben distribuiti.

Dopo 16 giorni (Fig.3, D - F), a livello dei ventricoli il tessuto era alterato con perdita della struttura: si evidenziavano spazi probabilmente di natura edematosa, con le cellule che apparivano molto distanziate tra loro. Anche a livello della superficie ependimale il tessuto appariva alterato e disomogeneo, differente da quello dei controlli.

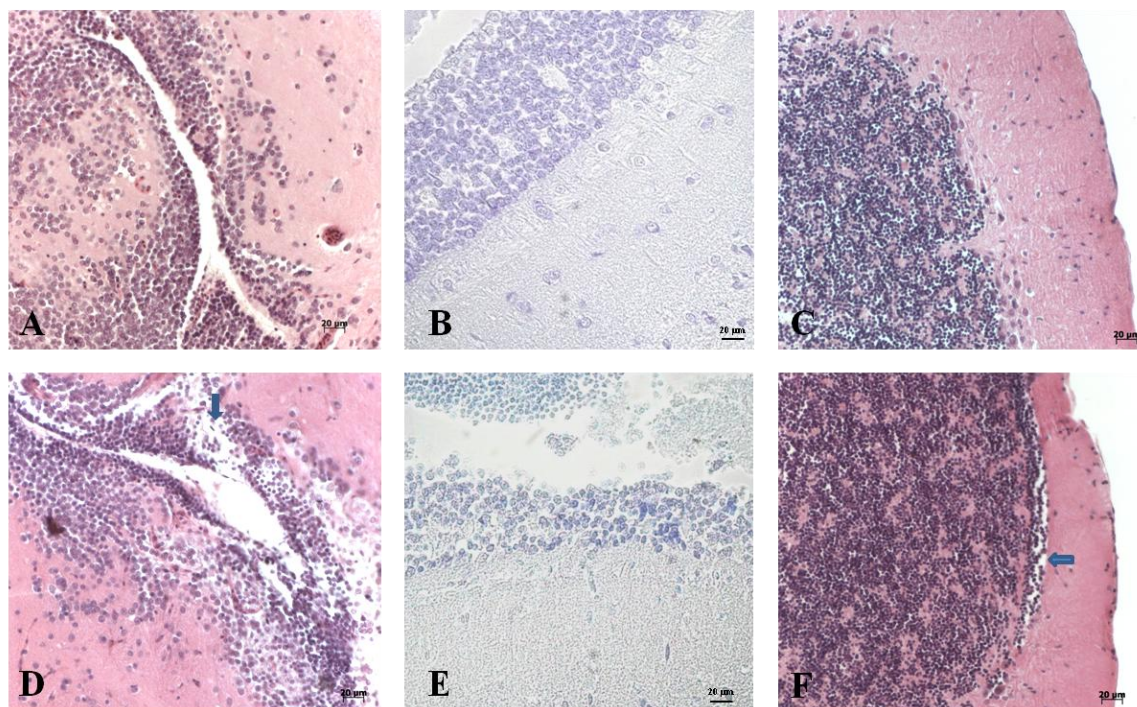


Figura 3

A: Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Colorazione emallume-eosina. Il tessuto appare omogeneo con cellule aventi struttura compatta e contorni ben definiti a livello ventricolare.

B: Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Colorazione cresyl violetto. Il tessuto appare omogeneo con cellule aventi struttura compatta e contorni ben definiti.

C: Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Colorazione emallume-eosina. Tessuto ben conservato e distribuzione delle cellule regolare.

D: Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 16 giorni di trattamento. Colorazione emallume-eosina. Sono evidenti spazi dilatati, probabilmente di natura edematosa; le cellule appaiono molto distanziate tra loro a livello ventricolare.

E: Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 7 giorni di trattamento. Colorazione cresyl violetto. Superficie ependimale irregolare a livello dei ventricoli.

F: Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, dopo 16 giorni di trattamento. Colorazione emallume-eosina. A livello del cervelletto il tessuto appare alterato.

6.3.3 *Analisi dell'integrità della mielina*

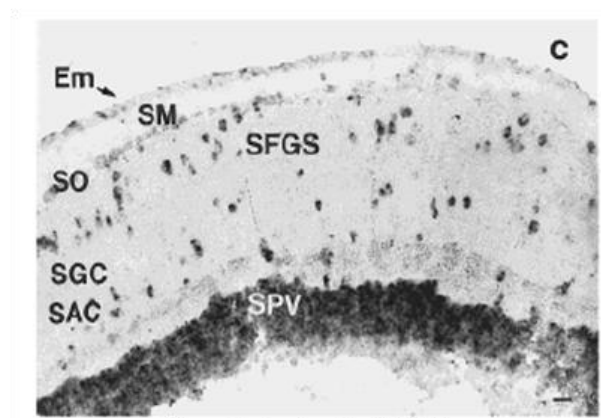
L'analisi isto-morfologica effettuata mediante l'utilizzo della colorazione con "Methasol Fast Blue" ha messo in luce in particolare l'alterazione esercitata dal Cd sulla componente mielinica dell'encefalo del teleosteo *Danio rerio*.

I risultati ottenuti ci hanno mostrato la validità di questa colorazione anche nell'encefalo di questo pesce, mettendo in luce prolungamenti e fibre nervose sparse in tutto l'encefalo di *Danio rerio*, esclusivamente nella sostanza bianca delle zone cerebrali osservate a differenza della sostanza grigia che non ha messo in luce elementi colorati (Fig.4). Le cellule nervose trasmettono i segnali elettrici, definiti potenziale d'azione, attraverso lunghe fibre, gli assoni, i quali sono ricoperti da una sostanza isolante, la guaina mielinica. Lesioni a livello di questa guaina provocano danni agli assoni che non sono più in grado di trasmettere efficacemente i segnali. Questi possono essere messi in evidenza attraverso metodi elettivi di colorazione per la mielina come il "methasol fast blue".

Nei campioni di controllo (Fig.4, A-B-C-D-E-F) le fibre mieliniche messe in evidenza non mostrano alterazioni, i contorni sono ben definiti e la colorazione è marcata.

Nel tetto ottico degli animali non esposti al cadmio sono state messe in evidenza con la colorazione (Fig.4, A) fibre nervose a decorso tangenziale presenti nello strato opticum (SO), strato fibrosum e griseum superficiale (SFGS) e nello strato album centrale (SAC). La stratificazione del tetto ottico di *Danio rerio* così come degli alti

teleostei consiste di 6 strati tangenziali. Questi strati presentano una differente composizione in fibre e in cellule. Dalla pia madre al ventricolo gli strati si susseguono in tale ordine: stratum fibrosum marginale (SM), stratum optimum (SO), stratum fibrosum et griseum superficiale (SFGS), stratum griseum centrale (SGC), stratum album centrale (SAC) e stratum griseum periventricolare (SPV). Lo SPV è composto predominantemente da cellule (neuroni piriformi), mentre gli assoni amielinici si trovano in modo predominante nello SM. Gli altri strati contengono cellule sparpagiate tra i neuriti provenienti da differenti siti cerebrali.



Pradel et al., 1999

Le afferenze del tetto ottico derivano da differenti sistemi e nuclei sensoriali. Gli assoni amielinici dello SM originano dal toro longitudinale. Lo SO e SFGS ricevono il grosso dai terminali retinici. Le informazioni meccanorecettive raggiungono gli strati

SAC e SGC del tetto dal toro semicircolare ricevendo input dai nervi vestibolari e della linea laterale. Il telencefalo proietta verso lo SGC, mentre dal diencefalo numerosi nuclei pretettali, talamici e ipotalamici contribuiscono alle afferenze del tetto. Altre afferenze derivano da nuclei pretettali, il toro semicircolare, il toro longitudinale, i nuclei del tegmentum così come quelli reticolare del romboencefalo rostrale.

Il tegmentum (Fig.4, B) costituisce la porzione ventrale del mesencefalo ed ha un ruolo dominante nelle funzioni motorie come quella dell'occhio in quanto contiene il nucleo del nervo oculomotore e il nucleo del nervo trocleare, e tanti altri nuclei per altri movimenti. Si osservano nel mesencefalo vasi e fasci longitudinali di fibre provenienti dal telencefalo che vanno a formare il peduncolo cerebrale. Il tegmentum è la zona di passaggio e di elaborazione delle vie afferenti ed efferenti con il diencefalo, midollo allungato, il cervelletto e il midollo spinale.

Si osserva perfettamente che il colorante ha evidenziato in modo soddisfacente la sostanza bianca del cervelletto (Fig.4, C), zona ingrandita nella figura D, dove si osservano le fibre mieliniche messe maggiormente in evidenza. Queste non mostrano alterazioni, i contorni sono ben definiti e l'intensità della colorazione risulta particolarmente apprezzabile. La sostanza grigia invece risulta negativa alla colorazione, conferma del fatto che il metodo è un ottimo colorante per mettere in evidenza la mielina. Altre porzioni dell'encefalo dove non si è riscontrata una notevole affinità al colorante, sono le fibre del telencefalo (Fig.4, E).

Eccellente è stata anche la messa in evidenza di neuroni del midollo allungato (Fig. 4, F) risultati positivi alla colorazione e di alcuni si possono osservare anche i dendriti. Il midollo allungato (Fig.4, F) è in continuazione con il midollo spinale, che contiene nuclei motori e sensoriali (dal nervo trigemino al nervo vago).

I nuclei sensoriali del romboencefalo ricevono afferenze da recettori cutanei generali, dai bottoni gustativi, dai recettori della linea laterale, dai recettori vestibolari (equilibrio e accelerazione) e dai recettori dei suoni. I nuclei somato-motori innervano i muscoli delle mascelle e di archi branchiali. Il midollo allungato contiene alcuni centri di controllo di funzioni vitali, come la regolazione del battito cardiaco, la respirazione la deglutizione e la pressione del sangue.

Nella Figura 5 sono messe in evidenza solo le parti dell'encefalo che hanno subito danni in seguito all'esposizione al Cd, risultati positivi alla colorazione. Alterazioni a livello della guaina mielinica cominciano a manifestarsi dopo 7 giorni di esposizione, rimanendo simili dopo 16 giorni. Maggiori alterazioni si sono riscontrate a livello del tetto ottico e della sostanza bianca del cervelletto, dove si osserva una riduzione notevole dell'affinità tintoriale del tessuto. Nel tetto ottico (Fig.5, B) la colorazione a carico dei tre strati in precedenza descritti, stratum opticum, stratum fibrosum et griseum superficiale, stratum album centrale, risultata particolarmente evidente nei pesci di controllo risulta quasi svanita nei pesci esposti per 7 e per 16 giorni al CdCl_2 (Fig.5, A e B). Particolarmente ridotta risulta anche la colorazione a livello della

sostanza bianca del cervelletto (Fig.5, C e D), caratteristica osservata in tutti i pesci sottoposti alla colorazione.

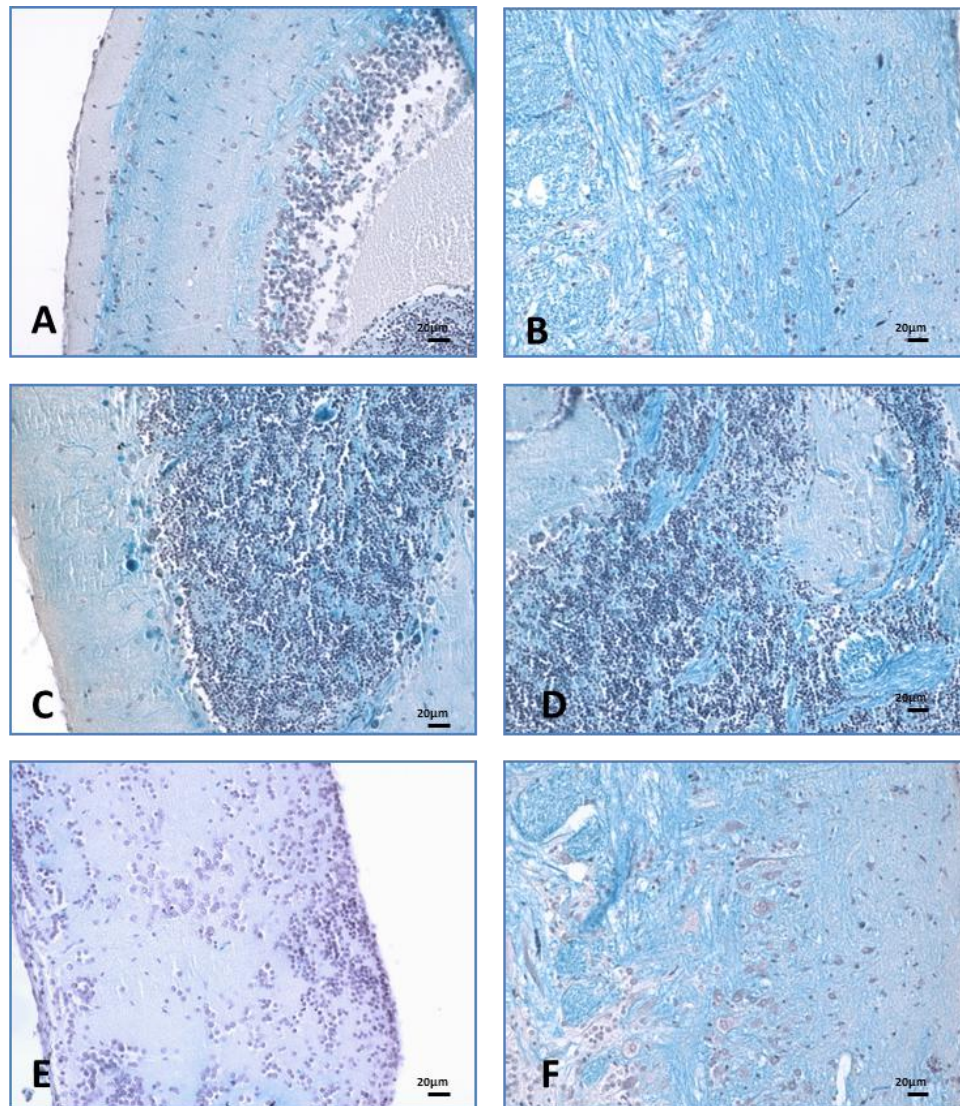


Figura 4.

Immagini: Colorazione MFB-emallume. Sezione sagittale, encefalo di *Danio rerio*, controllo. **A:** Il tessuto appare omogeneo con cellule aventi struttura compatta e contorni ben definiti. **B:** encefalo (tegmentum) di *Danio rerio*, controllo. Il tessuto appare omogeneo con cellule aventi struttura compatta e contorni ben definiti. **C:** Gli elementi cellulari nel cervelletto sono ben distribuiti. **D:** Gli elementi cellulari della sostanza bianca sono ben distribuiti. **E:** Il tessuto appare omogeneo con cellule aventi struttura compatta e contorni ben definiti. **F:** Il tessuto appare omogeneo con cellule aventi struttura compatta e contorni ben definiti.

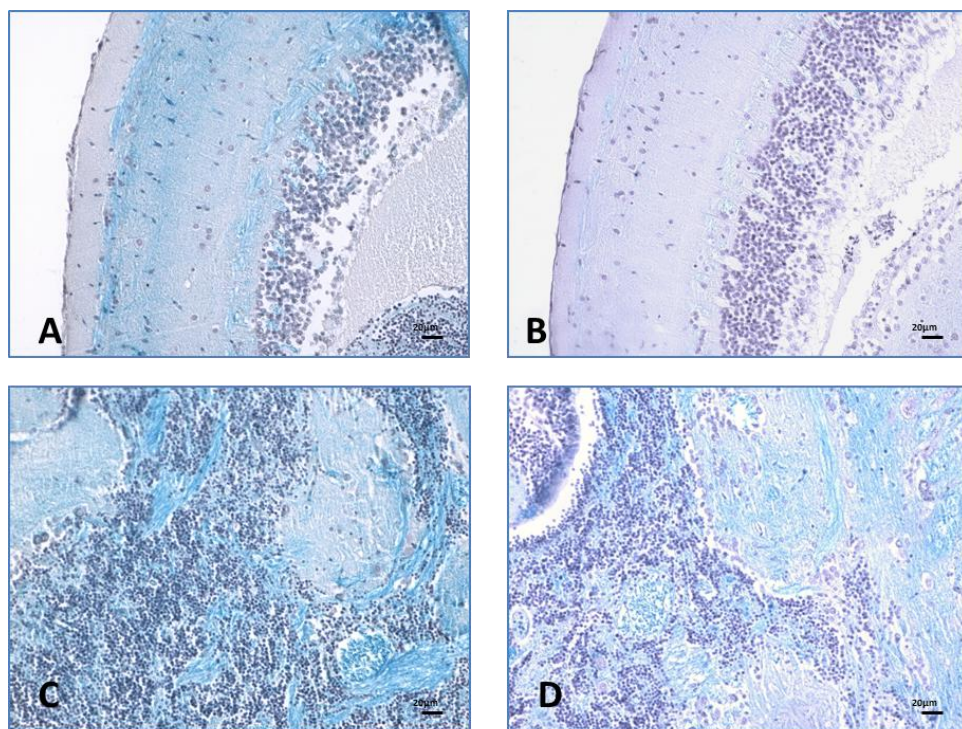


Figura 5

Immagini: Colorazione MFB-emallume. Sezione sagittale, encefalo (tetto ottico e cervelletto) di *Danio rerio*, controllo e trattati.

A: Il tessuto appare omogeneo con cellule aventi struttura compatta e contorni ben definiti.

B: dopo 7 giorni di trattamento appaiono alterazioni nel tetto ottico, con presenza di cellule dislocate diversamente; mentre più internamente si notano spazi intercellulari di differente ampiezza.

C: Gli elementi cellulari della sostanza bianca del cervelletto di encefalo di controllo sono ben distribuiti. **D:** dopo 7 giorni di trattamento nella sostanza bianca si nota una rilevante disorganizzazione tissutale e riduzione della colorazione.

6.3.4 Analisi della fluorescenza con Fluorojade C

L'applicazione della tecnica isto-chimica con Fluorojade-C, volta alla rivelazione di possibili fenomeni neurodegenerativi, ha permesso di riscontrare, mediante la realizzazione delle immagini con microscopio a fluorescenza, un diffuso segnale fluorescente a carico delle cellule nervose, nel diencefalo, cervelletto e nel telencefalo degli esemplari di *Danio rerio* per i quali la finestra temporale di esposizione al metallo corrispondeva a 16 giorni (Fig.6, B, D, F). Per gli esemplari di controllo e per quelli esaminati dopo 2 e 7 giorni dall'inizio del trattamento non è stata riscontrata alcuna positività (Fig.6, A, C, E).

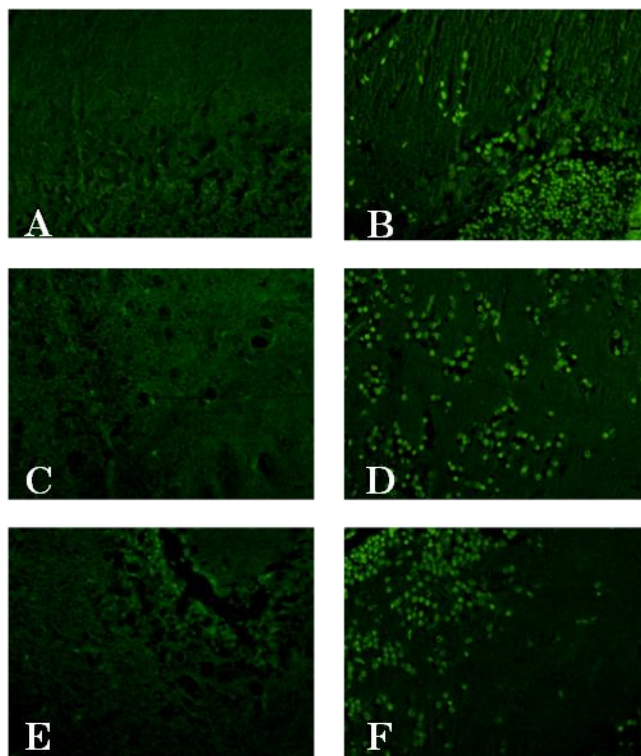


Figura 6

Immagini: Sezioni sagittali, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rivelazione Fluorojade C. **A:** assenza di segnale fluorescente a livello del cervelletto; **C:** assenza di segnale fluorescente a livello del telencefalo; **E:** assenza di segnale fluorescente a livello del diencefalo. Sezioni sagittali encefalo di *Danio rerio*, dopo 16 giorni di trattamento. Rivelazione con Fluorojade C. **B:** presenza di segnale fluorescente a livello del cervelletto; **D:** presenza di segnale fluorescente a livello del telencefalo; **F:** presenza di segnale fluorescente a livello del diencefalo.

6.4 Analisi dell'espressione genica

6.4.1 Variazione del marker GFAP

Gli esperimenti di western blotting effettuati su proteine totali estratte dagli encefali dei pesci di controllo, hanno mostrato l'espressione basale del marker GFAP preso in considerazione per attestare possibili alterazioni a carico delle cellule della astroglia. I segnali ottenuti dall'utilizzo dell' anticorpo anti GFAP sono stati normalizzati mediante il rapporto con il segnale ottenuto, per ciascun punto sperimentale, con l'utilizzo dell'anticorpo diretto contro la β -Actina. Gli esperimenti di immunoblotting, seguiti da analisi densitometriche, hanno messo in evidenza che il *segnale della GFAP risulta significativamente ridotto* ($***p<0,001$) già dopo due giorni di esposizione al Cd, arrivando a ridursi del 50% rispetto al controllo dopo 16 giorni di trattamento (Fig.7, B).

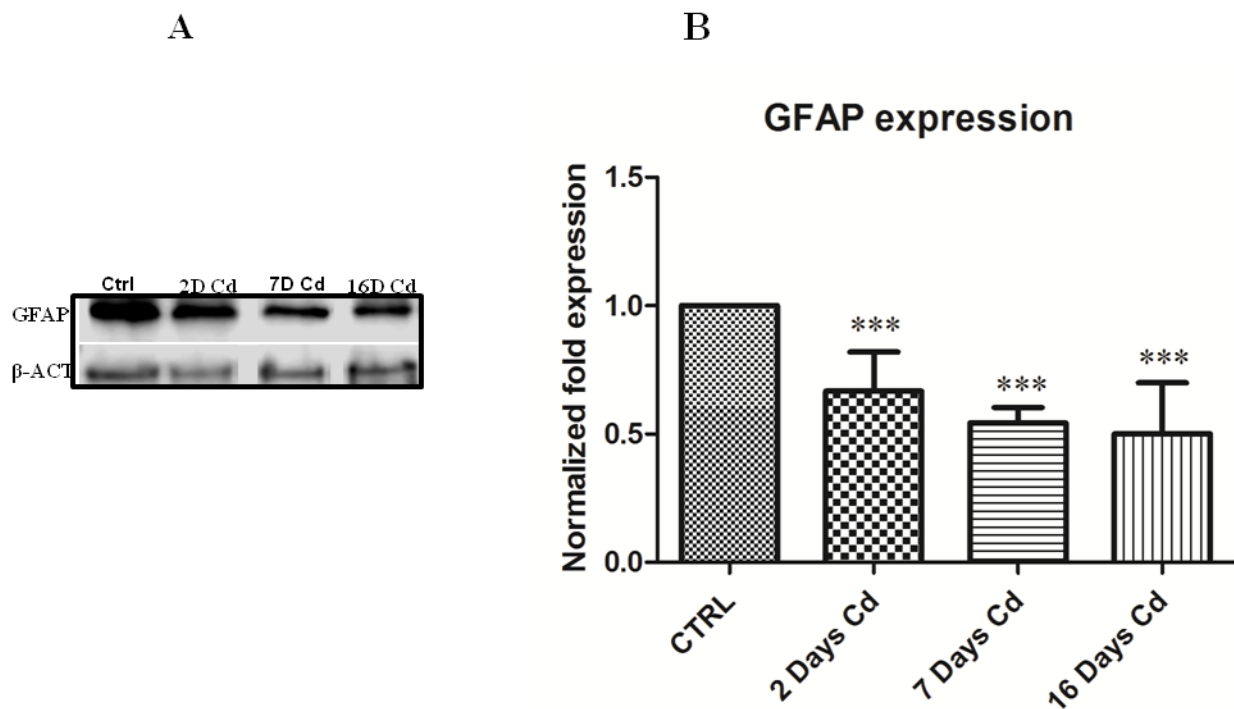


Figura 7; A: Bandeggio di un esperimento di immunoblotting effettuato con gli anticorpi anti-GFAP e anti- β Actina (usato come normalizzatore); **B:**Rappresentazione grafica dei livelli medi di accumulo della proteina GFAP negli encefali dei pesci esposti per 2, 7 e 16 giorni a CdCl_2 rapportati a livelli medi negli encefali dei pesci di controllo. L'analisi della significatività statistica delle differenze relative ai controlli è stata effettuata mediante il test ANOVA (analisi della varianza, con p value impostato = 0,05);***p<0,001.

Gli esperimenti di immunoistochimica effettuati con l'anticorpo anti-GFAP su sezioni seriali di encefalo di *Danio rerio* hanno messo in evidenza negli esemplari di *controllo*, gli elementi positivi alla **GFAP**. Questi erano presenti nel midollo allungato in cui vi sono numerosi fasci di fibre aventi differente lunghezza e decorso (Fig.8, C). Sono state osservate anche nel telencefalo fibre a decorso radiale che dal ventricolo si congiungono alla superficie piaie (Fig.8, D). A livello dei ventricoli encefalici è stata evidenziata una discreta immunoreattività, con collocazione sostanzialmente sottoventricolare (Fig.8, B).

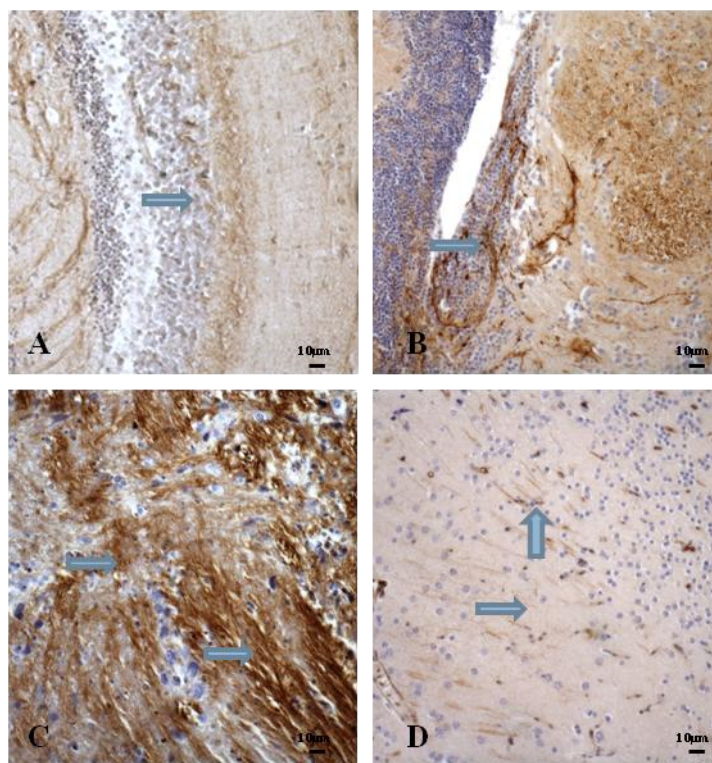


Figura 8. Immagini: Sezioni Sagittali, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rilevazione Anti-GFAP. **A:** positività presente a livello mesencefalico; **B:** fibre immunoreattive in zona sottoventricolare del ventricolo mesencefalico; **C:** marcata positività a carico di fibre a differente decorso del midollo allungato; **D:** fibre a decorso radiale gfap positive nel telencefalo dorsale.

La proteina GFAP è soggetta alla tossicità del cadmio, infatti in accordo con quanto riscontrato mediante gli esperimenti di western blotting, dopo 2 *giorni di trattamento* è stata osservata una riduzione delle fibre a livello del midollo allungato (Fig. 9, C) e a livello del telencefalo (Fig. 9, D).

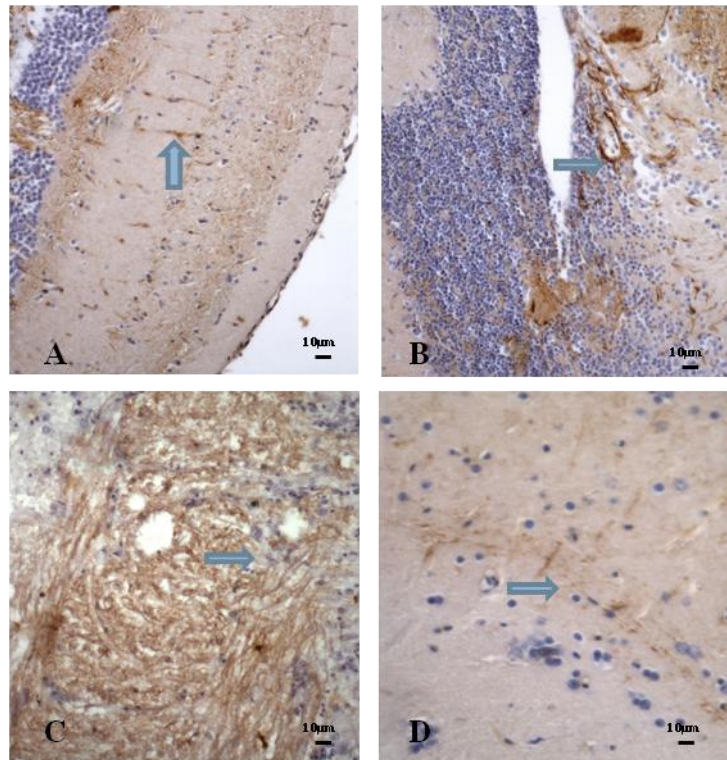


Figura 9. Immagini: Sezioni Sagittali, encefalo di *Danio rerio*, 2gg. Rilevazione anti-GFAP. **A:** leggera positività presente a livello del tetto ottico; **B:** immunoreattività ancora presente nella zona sottoventricolare del ventricolo mesencefalico; **C:** ridotta positività nelle fibre a differente decorso del midollo allungato; **D:** positività a carico del telencefalo dorsale.

Dopo 7 giorni d'esposizione a CdCl_2 nei pesci è stato riscontrato cambiamento dell'espressione della GFAP e nel midollo allungato e nel telencefalo una progressiva riduzione del segnale (Fig.10, C e D), con notevole riduzione anche a livello del ventricolo mesencefalico (Fig. 10, B).

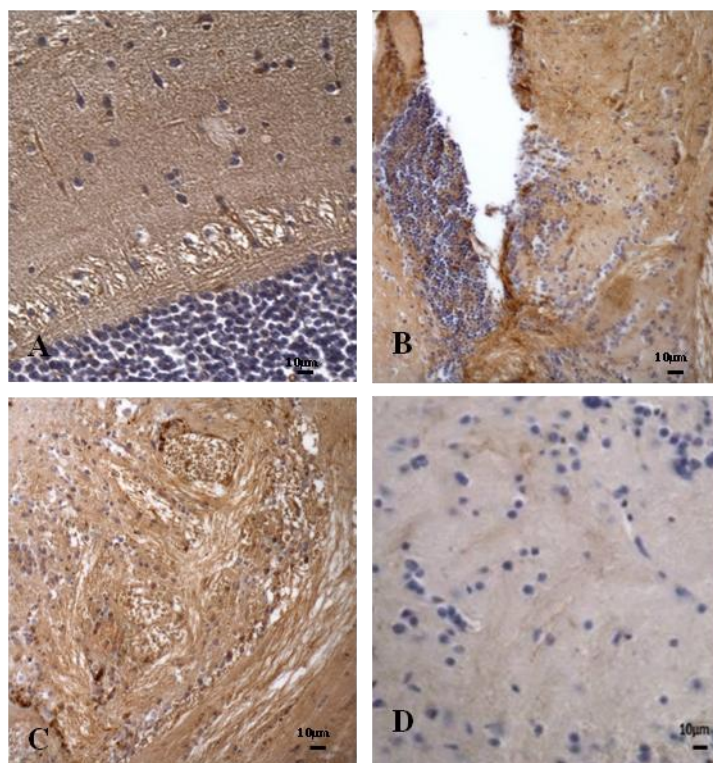


Figura 10. Immagini: Sezioni Sagittali, encefalo di *Danio rerio*, 7gg. Rilevazione Anti GFAP. **A:** positività assente a livello del tetto ottico; **B:** riduzione notevole della reattività a livello del ventricolo mesencefalico; **C:** scarsa reattività nel midollo allungato; **D:** presenza di scarso segnale nel telencefalo.

Dopo 16 giorni si osserva una situazione comparabile a quella osservata per gli individui esposti per 7 giorni (Fig. 11, A-D).

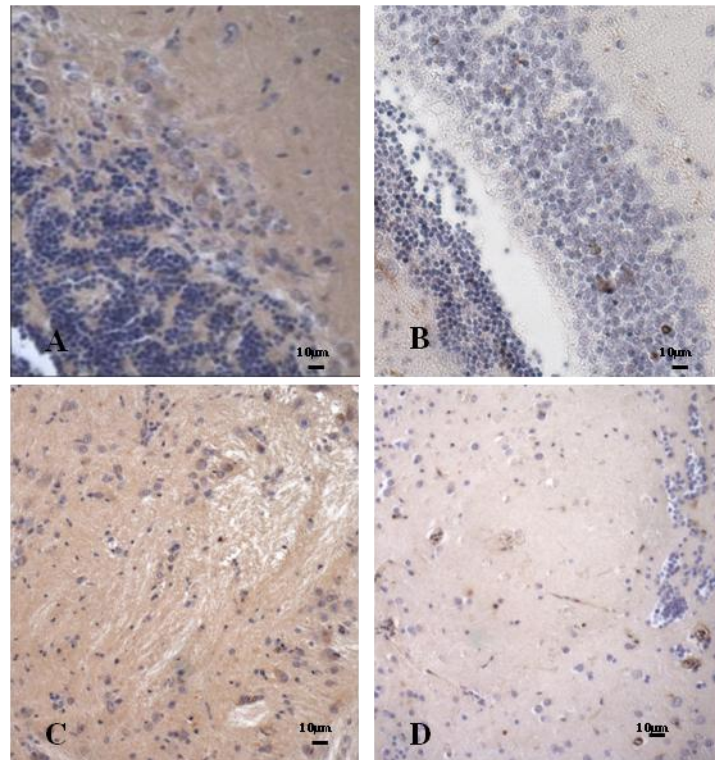


Figura 11. Immagini: Sezioni Sagittali, encefalo di *Danio rerio*, 16gg. Rilevazione Anti GFAP. **A:** positività assente a livello del tetto ottico; **B:** riduzione notevole della reattività a livello del ventricolo mesencefalico; **C:** scarsa reattività nel midollo allungato; **D:** presenza di scarso segnale nel telencefalo.

6.4.2 Variazione del marker peptide β -Amiloide₁₋₄₂

Il peptide β -amiloide, principale protagonista secondo l'ipotesi della cascata Amiloide della serie di eventi risultanti nella neurodegenerazione esistente nella patologia di Alzheimer, *mostra un notevole incremento* dei livelli di accumulo nell'encefalo dei pesci esposti a CdCl₂, riscontrato mediante gli esperimenti di western blotting. Dopo 2 giorni dall'inizio del trattamento il segnale derivato dall'anticorpo anti- β Amilode

(specifico per la forma fibrillogenica da 42 residui amminoacidici,₁₋₄₂) è risultato significativamente (* $p<0,05$) più intenso rispetto a quello di controllo di 2,5 volte (Fig.12, B). L'incremento del segnale arriva ad essere di 4 volte superiore dopo 7 giorni (** $p<0,01$), incremento che rimane costante anche dopo 16 giorni di esposizione (** $p<0,01$).

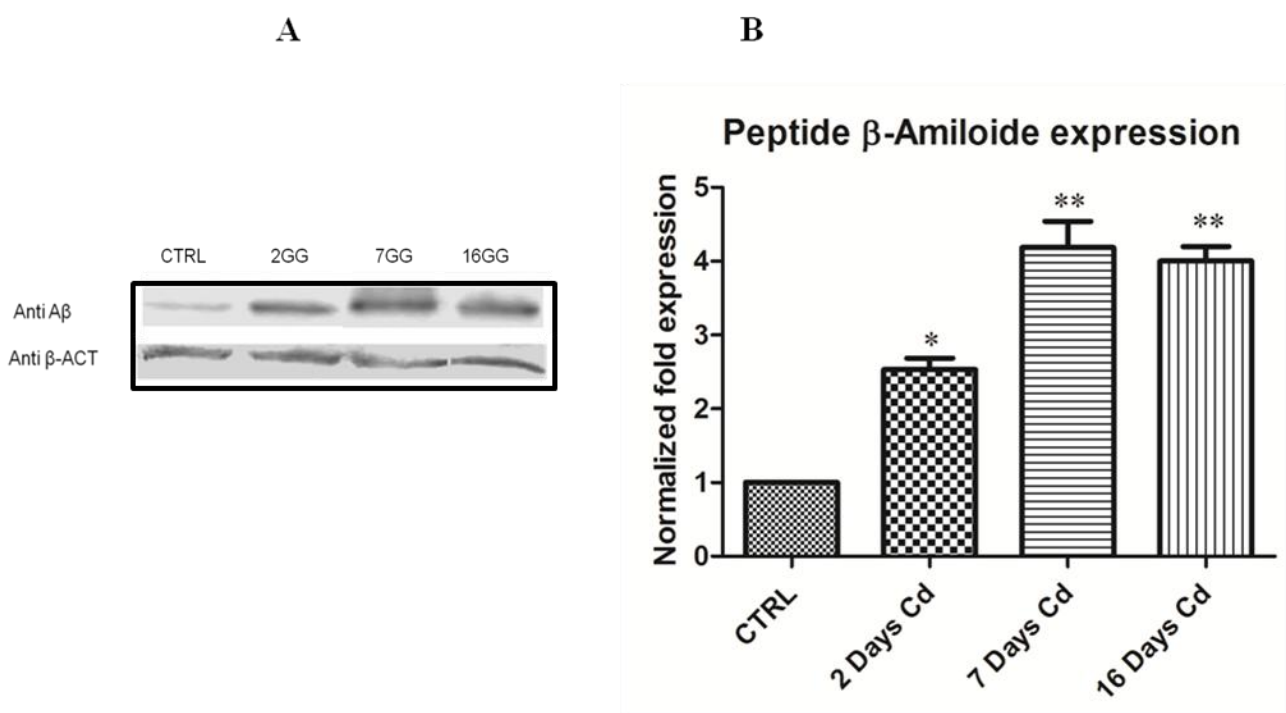


Figura 12. A: Bandeggio di un esperimento di immunoblotting effettuato con gli anticorpi anti- β amiloide e anti- β Actina (usato come normalizzatore); B: Rappresentazione grafica dei livelli medi di accumulo del peptide β -amiloide negli encefali dei pesci esposti per 2, 7 e 16 giorni a CdCl_2 rapportati a livelli medi negli encefali dei pesci di controllo. L'analisi della significatività statistica delle differenze relative ai controlli è stata effettuata mediante il test ANOVA (analisi della varianza, con p value impostato =0,05); * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Gli esperimenti di immunoistochimica effettuati su sezioni seriali di encefalo di *Danio rerio* hanno messo in evidenza negli esemplari di *controllo* gli elementi positivi al peptide β -Amiloide₁₋₄₂, presenti a carico delle cellule nervose, in particolare nei corpi

cellulari dei neuroni, in zona perinucleare. Sono risultate positive cellule nervose del bulbo olfattivo, cellule telencefaliche del pallio e del subpallio (Fig. 13, A e B). L'anticorpo anti β -Amiloide ha inoltre evidenziato in particolar modo le cellule del Purkinje e alcune cellule sparse nello strato molecolare della corteccia cerebellare (Fig. 13, E ed F) così come cellule con abbondante citoplasma presenti nel midollo allungato (Fig. 13, D).

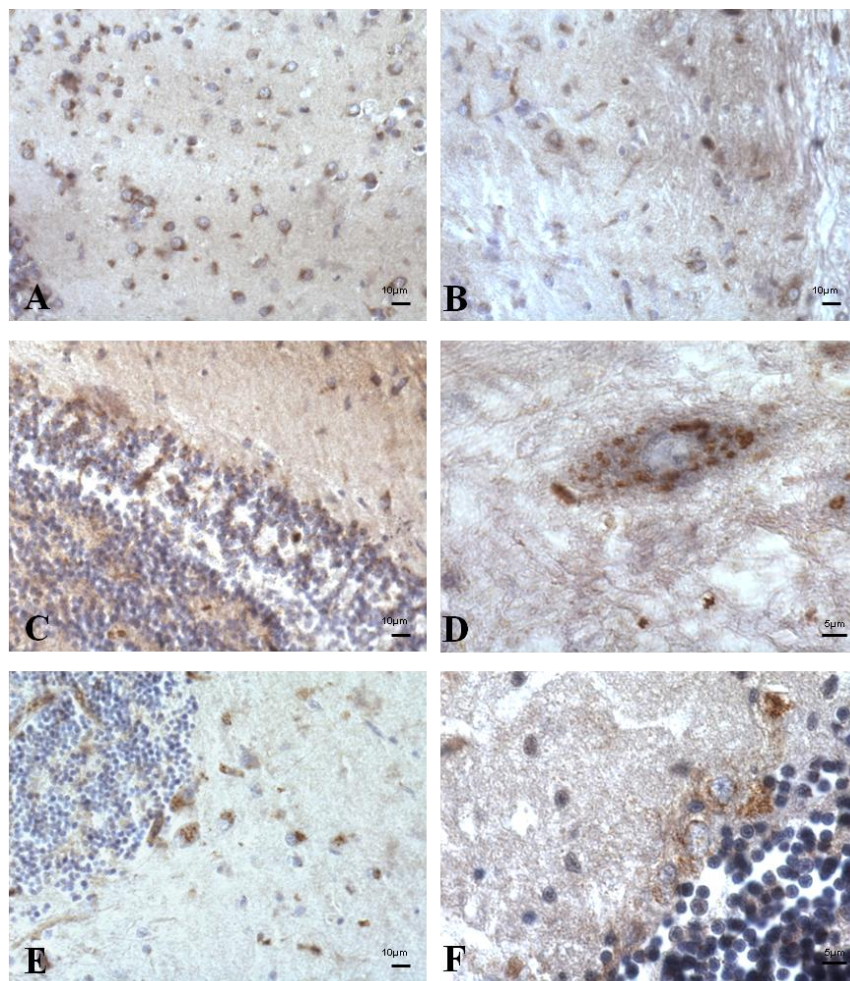


Figura 13. Immagini: Sezioni Sagittali, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rilevazione Anti β -Amiloide. **A:** leggera positività presente a livello del telencefalo; **B:** diencefalo con cellule immunopositive; **C:** leggera positività in cellule aventi scarso citoplasma nel tetto ottico; **D:** particolare in evidenza di cellula con abbondante citoplasma immunopositiva nel midollo allungato; **E:** cellule del Purkinje positive nel cervelletto; **F:** Particolare in evidenza, cellule del Purkinje.

In accordo con quanto riscontrato mediante gli esperimenti di western blotting è stato possibile riscontrare un aumento dell'immunoreattività, in termini di intensità del segnale, già dopo 2 giorni di esposizione al CdCl_2 . In particolare è stato osservato un aumento dell'intensità del segnale nelle cellule cerebellari del Purkinje (Fig.14, D,E,F) e nelle cellule telencefaliche palliali e subpalliali (Fig.14, A e B).

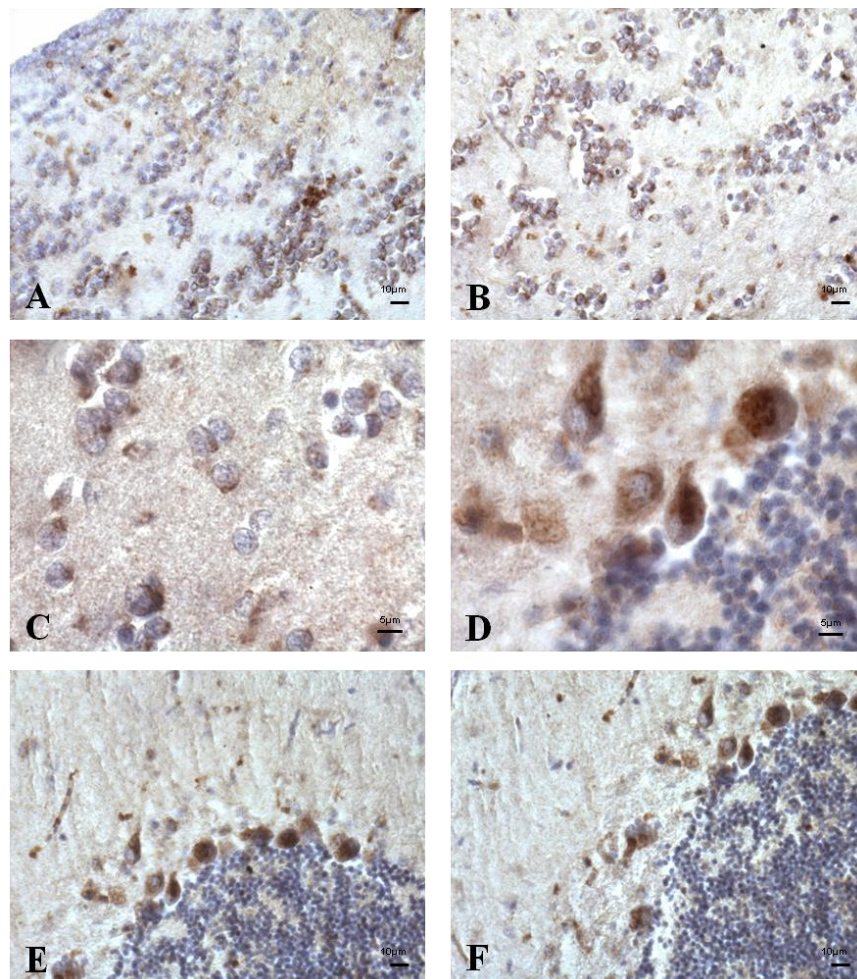


Figura 14. Immagini: Sezioni Sagittali, encefalo di *Danio rerio*, 2gg. Rilevazione Anti β -Amiloide. **A-B:** incremento della positività a carico delle cellule del telencefalo dorsale e ventrale; **C:** particolare di cellule positive del telencefalo; **D:** Particolare in evidenza, cellule del Purkinje immunoreattive; **E-F:** incremento lieve della positività a carico delle cellule immunopositive del cervelletto.

Dopo 7 giorni di esposizione è possibile osservare un aumento del segnale, sempre in termini di intensità della colorazione, anche a livello delle cellule granulari del cervelletto con una notevole messa in evidenza anche di fibre nervose positive presenti nello strato delle cellule del Purkinje (Fig.15, D,E,F), mentre nel telencefalo la situazione resta invariata (Fig.15, A e B).

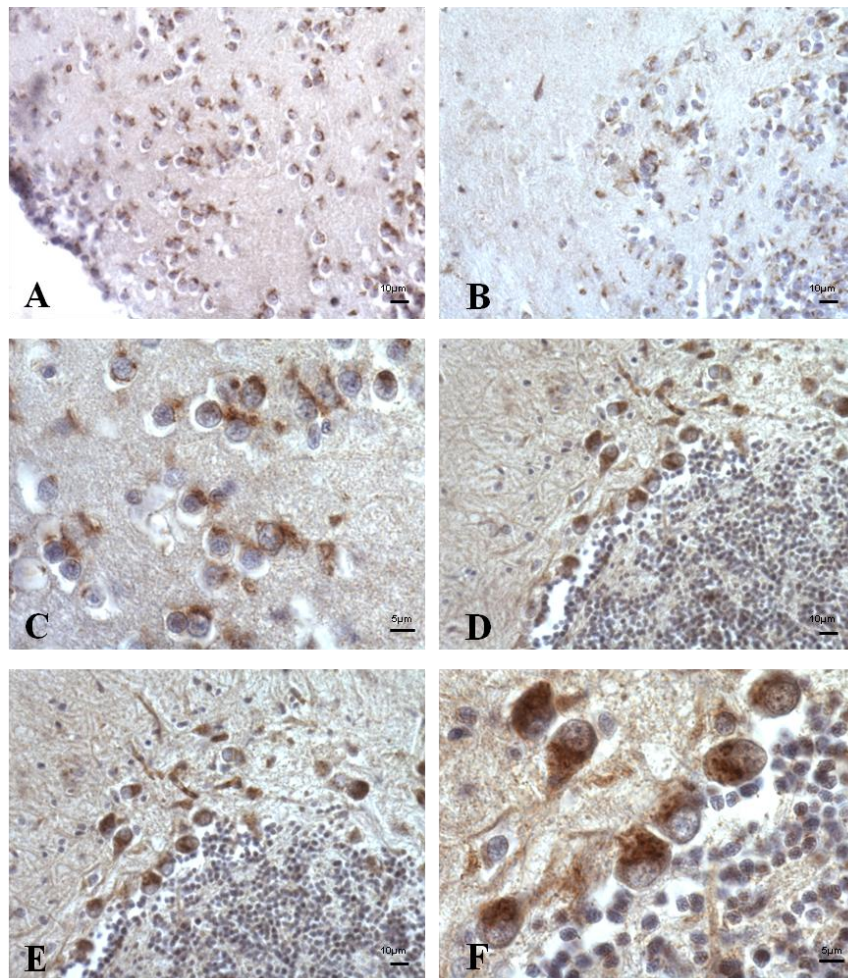


Figura 15. Immagini: Sezioni Sagittali, encefalo di *Danio rerio*, 7gg. Rilevazione Anti β -Amiloide. **A-B:** immunopositività presente a carico delle cellule del telencefalo dorsale e ventrale; **C:** particolare in evidenza di cellule del telencefalo con un aumento della positività; **D-E:** positività a carico delle cellule del cervelletto; **F:** particolare in evidenza dell'aumento dell'immunoreattività nelle cellule dello strato delle cellule del Purkinje.

Dopo 16 giorni di esposizione al CdCl_2 è inoltre interessante notare l'aumento dell'immunoreattività nell'area telencefalica dorsale con una maggiore presenza del segnale nel parenchima cerebrale circostante alle cellule nervose immunopositive, caratteristica non osservata dopo 2 e 7 giorni di esposizione, nei quali encefali il segnale resta confinato esclusivamente ai corpi cellulari (Fig.16, A, B).

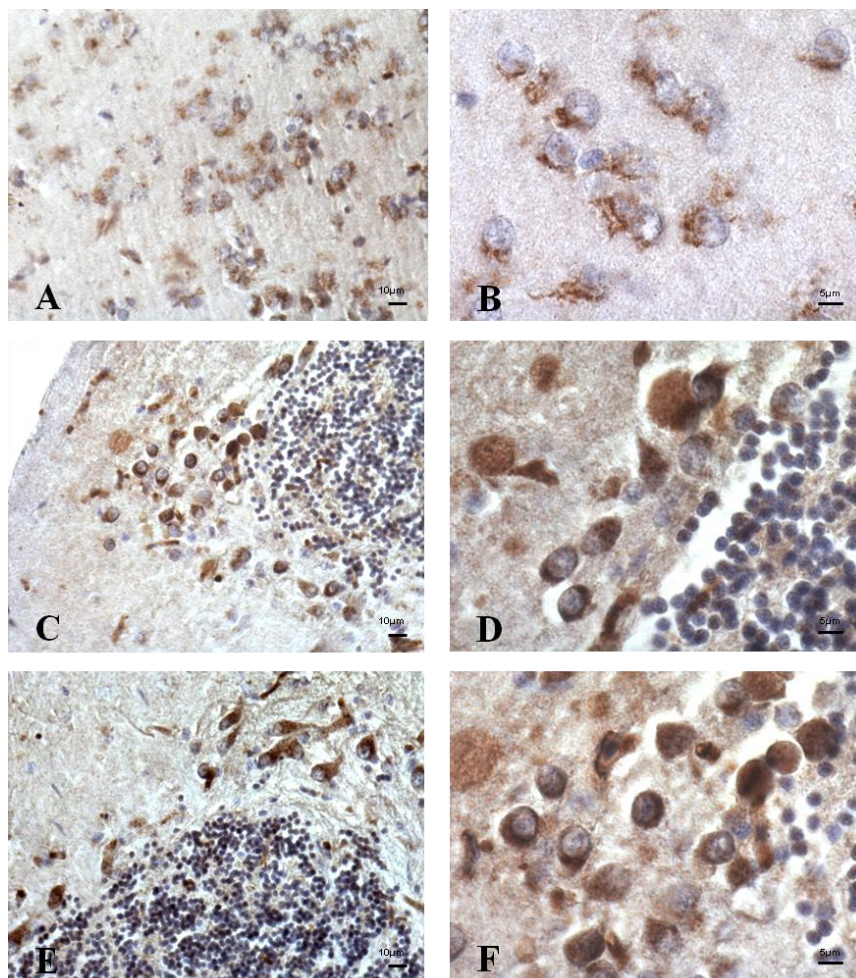


Figura 16. Immagini: Sezioni Sagittali, encefalo di *Danio rerio*, 16gg. Rilevazione Anti β -Amiloide. **A:** aumento della positività nella zona del telencefalo; **B:** particolare in evidenza della positività a carico delle cellule del telencefalo; **C-D:** aumento della positività a carico delle cellule dello strato delle cellule del Pukinje; **E-F:** particolari in evidenza della diffusa immunopositività a carico delle cellule cerebellari con positività parenchimale.

6.4.3 Variazione del marker *GLUD1*

Per quanto riguarda il segnale derivato dall'utilizzo degli anticorpi diretto contro antigeni caratteristico delle cellule nervose, è stato possibile osservare il *lieve incremento dei livelli d'accumulo della Glutammato Deidrogenasi* dopo 2 e 7 giorni dall'inizio del trattamento, enzima che arriva ad incrementarsi di quasi 3 volte dopo 16 giorni (Fig.17, B).

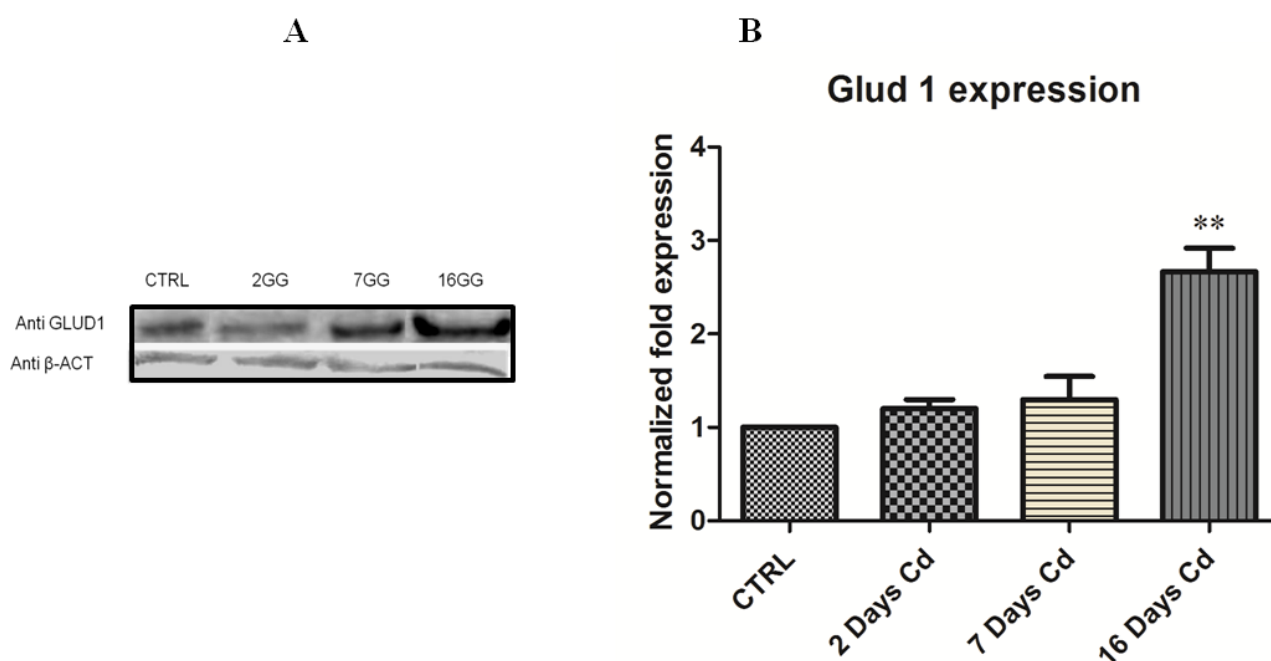


Figura 17. **A:** Bandeggio di un esperimento di immunoblotting effettuato con gli anticorpi anti-Glud1 e anti- β Actina (usato come normalizzatore); **B:** Rappresentazione grafica dei livelli medi di accumulo della glutammato deidrogenasi negli encefali dei pesci esposti per 2, 7 e 16 giorni a CdCl_2 rapportati a livelli medi negli encefali dei pesci di controllo. L'analisi della significatività statistica delle differenze relative ai controlli è stata effettuata mediante il test ANOVA (analisi della varianza, con p value impostato =0,05); **p<0,01.

Nell'encefalo degli esemplari di controllo, gli elementi positivi al GLUD1 erano presenti sia a carico dei corpi cellulari che a livello di fibre. In particolare sono

risultate positive le cellule cerebellari del Purkinje, così come nello stesso cervelletto si sono apprezzate fibre positive nella sostanza grigia (Fig.18, E e F). Fibre positive sono state riscontrate nel diencefalo, in zona peri-ipotalamica, e a livello del midollo allungato (Fig.18, B e C), così come nei corpi cellulari dei neuroni, dove sono stati messi in evidenza anche alcune cellule dalla forma stellata simil-astrocitarie. Molto lieve invece è risultata l'immunoreattività notata a livello del tetto ottico e del telencefalo (Fig.18, A e D).

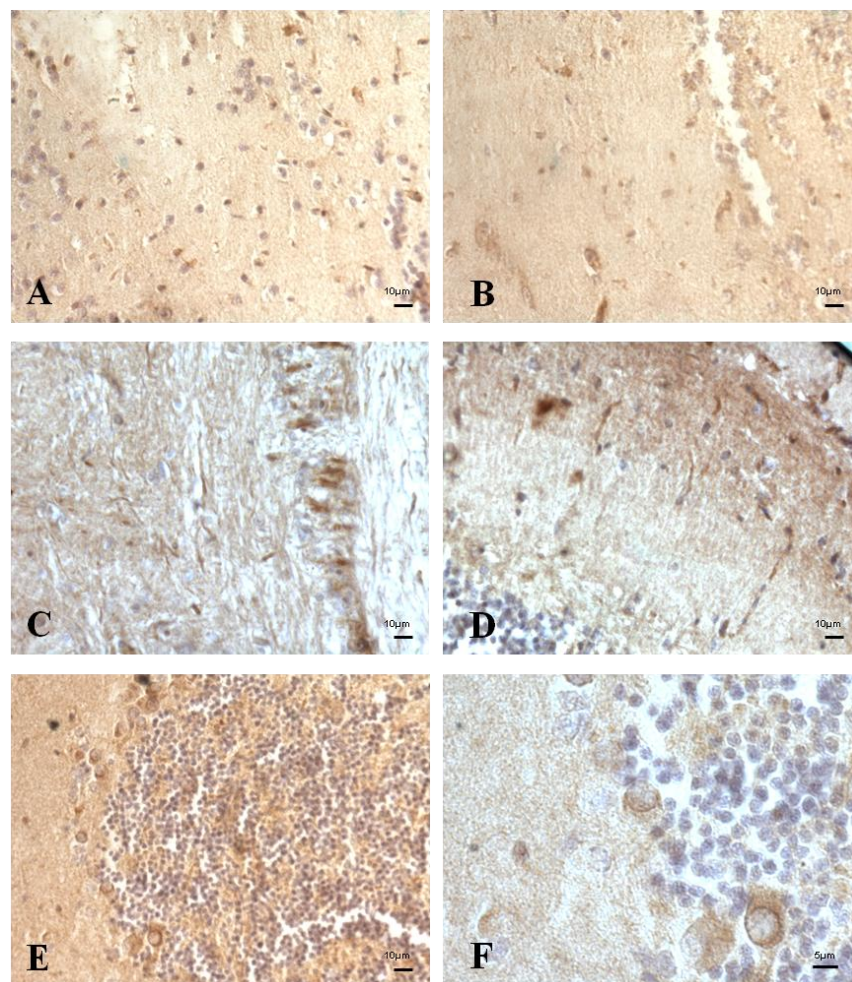


Figura 18. Immagini: Sezioni Sagittali, encefalo di *Danio rerio*, controllo. Rilevazione Anti-GLUD1. **A:** positività a carico delle cellule del telencefalo; **B:** diencefalo immunopositivo al GLUD1; **C:** cellule e fibre positive nel midollo allungato; **D:** fibre e cellule lievemente positive nel tetto ottico; **E:** immunopositività poco marcata a carico delle cellule cerebellari con fibre positive nella sostanza grigia; **F:** particolare in evidenza di cellula cerebellare positiva.

Dopo 2 *giorni* di esposizione al CdCl_2 è stato riscontrato un aumento del segnale nel diencefalo, in zona peri-ipotalamica, consistente in cellule con dei piccoli corpi cellulari e fibre sparse (Fig.19, A e B). Inoltre leggermente incrementato risulta il segnale a livello delle cellule de Purkinje, così come la presenza di fibre positive nella sostanza grigia del cervelletto (Fig.19, E ed F).

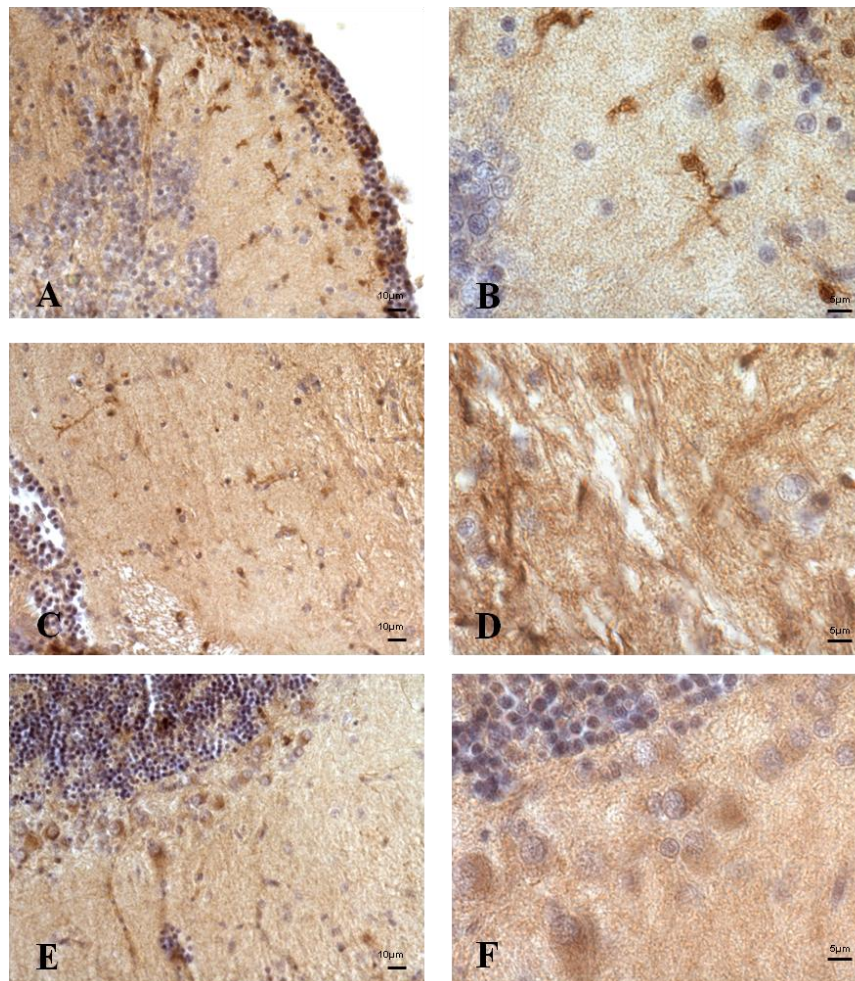


Figura 19. Immagini: Sezioni Sagittali, encefalo di *Danio rerio*, 2gg. Rilevazione Anti-GLUD1. **A:** aumento della positività nella zona del diencefalo; **B:** particolare in evidenza di cellule e prolungamenti immunopositivi nel diencefalo; **C:** incremento dell'immunoreattività in zona diencefalica peri-ipotalamica; **D:** particolare in evidenza di fibre immunopositive nella zona del diencefalo; **E:** immuopositività leggermente incrementata a livello cerebellare; **F:** particolare in evidenza di cellule cerebellari.

Dopo 7 *giorni* di esposizione si assiste ad un ulteriore incremento del segnale a livello delle cellule del Purkinje così come la rivelazione di prolungamenti diffusi nello strato delle medesime cellule (Fig.20, C-F), così come avviene per il segnale derivante dall'utilizzo dell'anticorpo anti- β Amiloide. Allo stesso modo vengono messe in evidenza anche cellule granulari. Inoltre risultano immunopositive anche fibre a decorso radiale nel tetto ottico non notate nell'encefalo dei pesci di controllo ed esposti per 2 giorni al CdCl_2 (Fig.20, A e B).

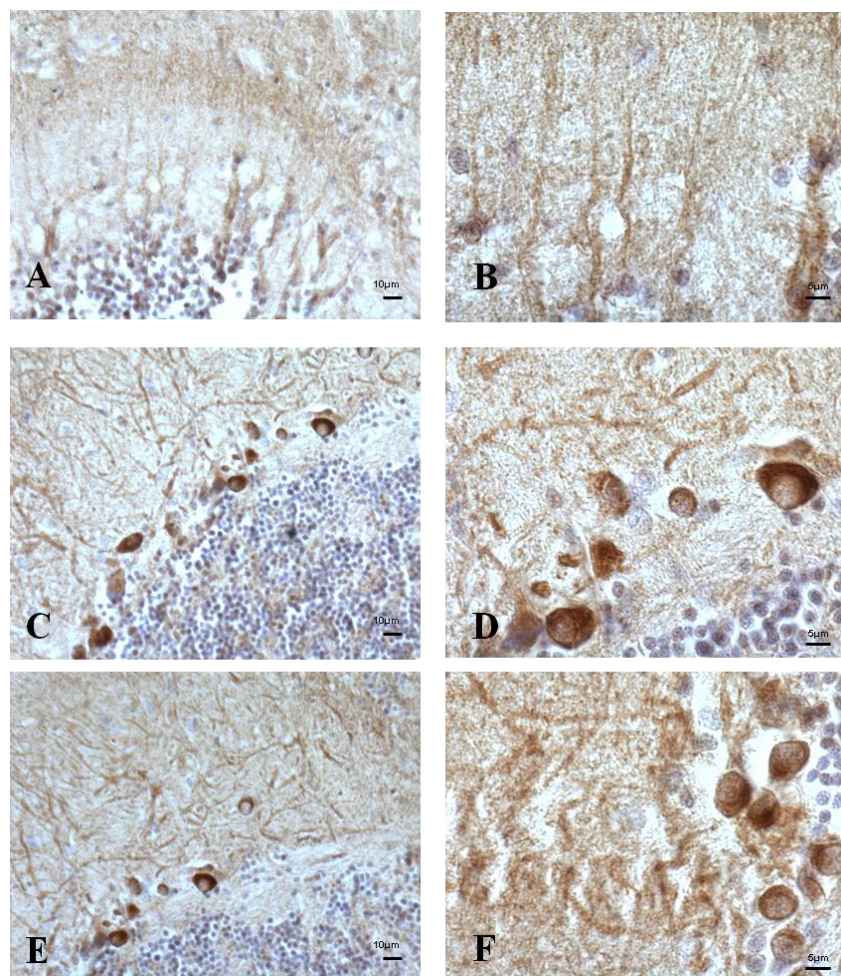


Figura 20. Immagini: Sezioni Sagittali, encefalo di *Danio rerio*, 7gg. Rilevazione Anti-GLUD1. **A:** aumento della positività a carico di cellule e fibre del tetto ottico; **B:** particolare in evidenza delle fibre immunopositive del tetto ottico; **C-D:** cellule cerebellari e fibre immunopositive nello strato delle cellule del Purkinje; **E-F:** particolare in evidenza di cellule e fibre cerebellari marcatamente positive.

In seguito a 16 giorni di trattamento è possibile osservare una positività marcata a carico delle cellule del Purkinje (Fig.21, E ed F) , così come la presenza di cellule e fibre positive nel diencefalo e in zona peri-ipotalamica (Fig.21, C e D). Inoltre a differenza degli altri punti sperimentali è stato possibile osservare una discreta positività anche a carico di corpi cellulari di cellule nervose del telencefalo sia in zona dorsale che ventrale (Fig.21, A e B).

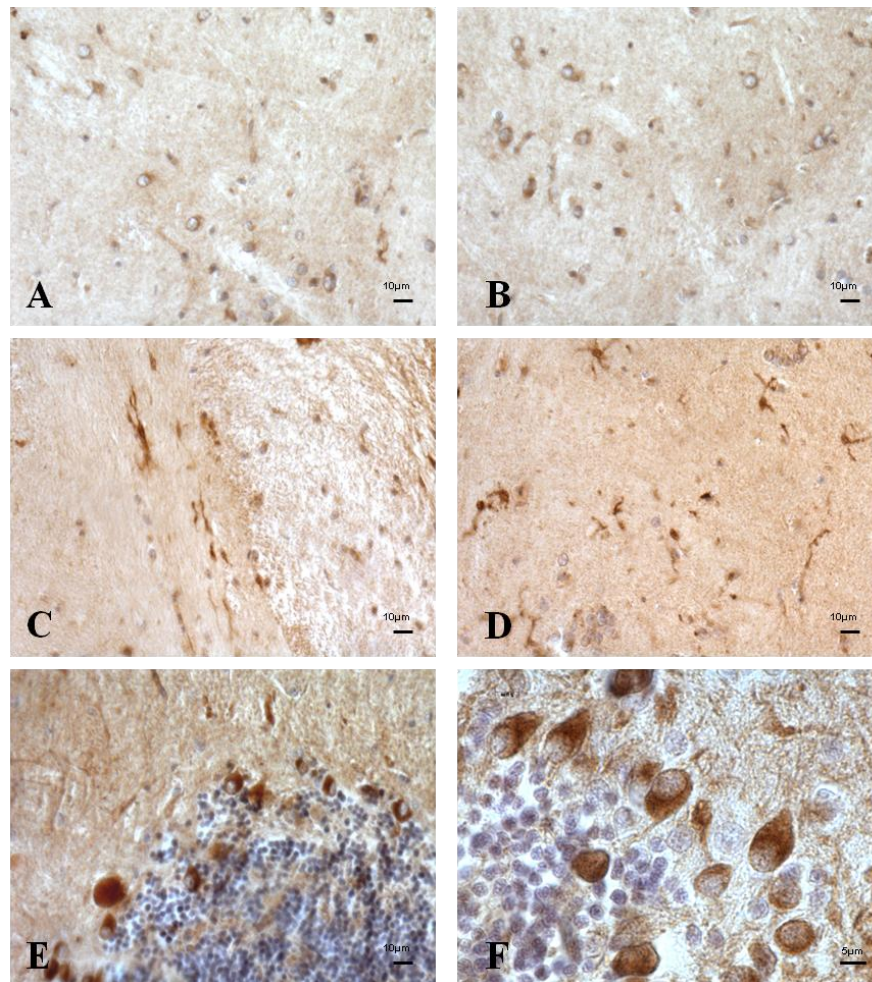


Figura 21. Immagini: Sezioni Sagittali, encefalo di *Danio rerio*, 16gg. Rilevazione Anti-GLUD1. **A-B:** aumento della immunoreattività a carico di cellule del telencefalo dorsale e ventrale; **C-D:** marcata positività a carico di cellule, prolungamenti e fibre, nella zona diencefalica; **E:** positività marcata a carico delle cellule cerebellari; **F:** particolare in evidenza di cellule e fibre cerebellari marcatamente positive.

6.4.4 Variazione del marker Interleuchina 1- β

Gli esperimenti di immunistoichimica indiretta effettuati su sezioni seriali di encefalo hanno mostrato un segnale blando sostanzialmente presente nel parenchima cerebrale a livello del midollo allungato. La positività non risulta a carico di corpi cellulari ma riguarda prolungamenti e la matrice circondante le cellule. E' stato possibile osservare un incremento notevole della reattività dell'anticorpo anti IL-1 β nel midollo allungato dei pesci esposti al CdCl₂ per due giorni, reattività che rimane ai livelli medesimi dopo 7 giorni di trattamento. La positività a tale reazione ritorna a livelli paragonabili a quelli del controllo invece dopo 16 giorni di esposizione probabilmente a causa di un fenomeno di adattamento allo stress indotto (Fig.22, A-D).

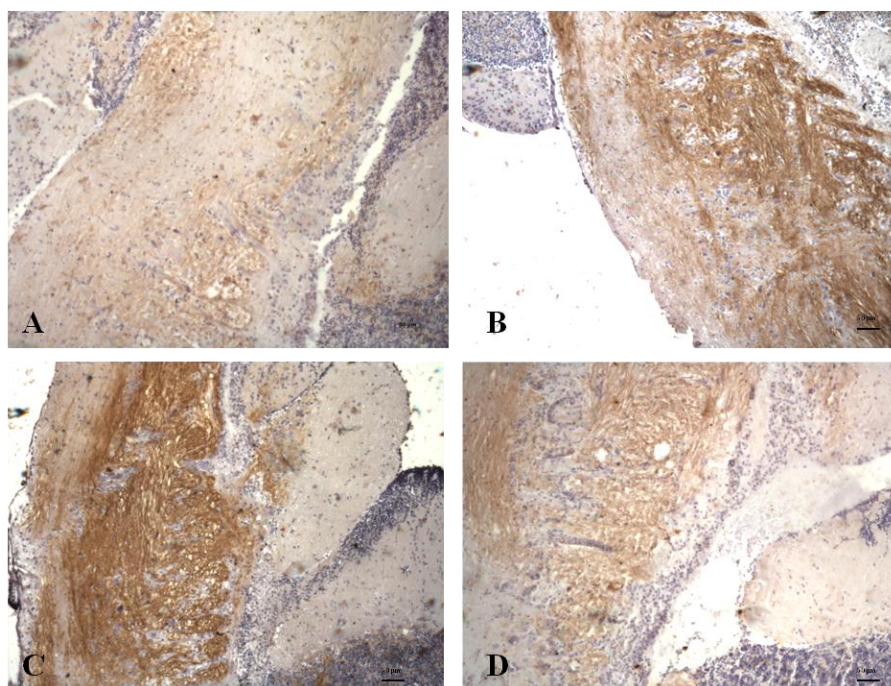


Figura 22. Immagini: Sezioni Sagittali, encefalo di *Danio rerio*, 16gg. Rilevazione Anti-IL 1 β . **A:** immunoreattività blanda presente a livello del midollo allungato degli individui di controllo; **B-C:** marcata positività a carico di fibre presenti nel midollo allungato dell'encefalo di individui tratta per 2 e 7 giorni; **D:** positività all'anticorpo tornata a livelli fisiologici nel midollo allungato di individui trattati per 16 giorni.

6.4.5 Variazione delle neurotrofine BDNF, NGF

Esperimenti di western blotting effettuati mediante l'utilizzo dell'anticorpo anti-BDNF hanno mostrato la presenza di due bande negli estratti proteici derivati dagli encefali dei pesci, rispettivamente a circa 28 e 13 kDa, consistenti rispettivamente al peso molecolare predetto della forma immatura e alla forma matura. La banda a 28 kDa ha mostrato un segnale molto più intenso e per questo motivo le analisi quantitative sono state effettuate prendendo in considerazione tale banda. E' stato osservato un decremento significativo (* $p < 0,05$) rispetto al controllo del 40% dopo 2 e 7 giorni di trattamento (Fig. 23, B), riduzione che arriva al 50% dopo 16 giorni (Fig.23, B)

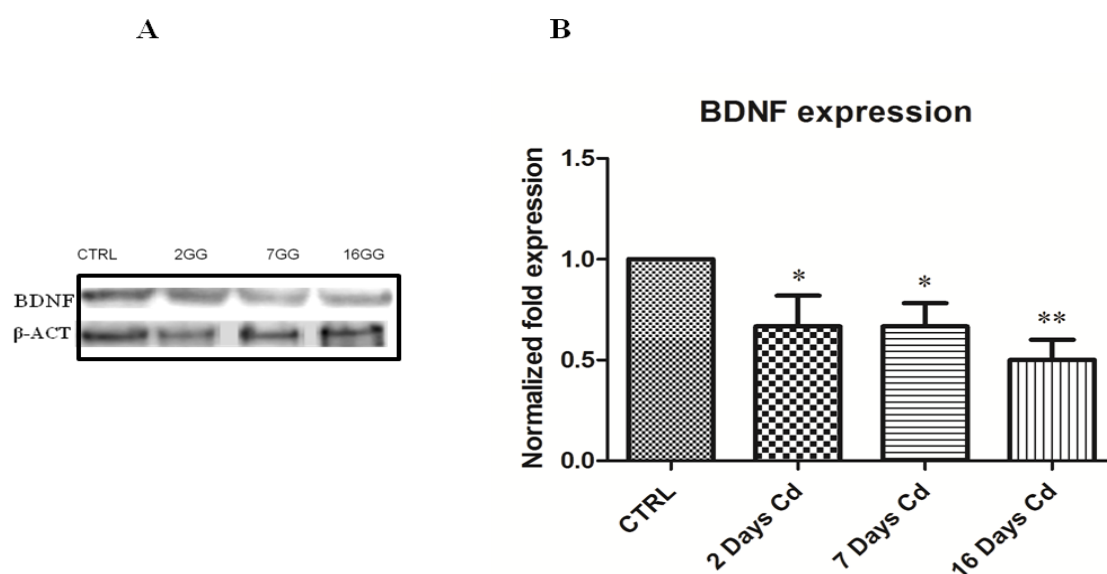


Figura 23. A: Bandeggio di un esperimento di immunoblotting effettuato con gli anticorpi anti-BDNF e anti- β Actina (usato come normalizzatore); B: Rappresentazione grafica dei livelli medi di accumulo di BDNF negli encefali dei pesci esposti per 2, 7 e 16 giorni a CdCl_2 rapportati a livelli medi negli encefali dei pesci di controllo. L'analisi della significatività statistica delle differenze relative ai controlli è stata effettuata mediante il test ANOVA (analisi della varianza, con p value impostato =0,05); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Gli esperimenti di immunistoichimica effettuati su sezioni seriali di encefalo di individui adulti non hanno mostrato positività all'anticorpo anti-NGF a differenza di quanto osservato nelle larve di 5 giorni di sviluppo in cui è stata osservata una marcata reattività all'anticorpo in tutto l'encefalo sostanzialmente a livello del parenchima (Fig.24, C e D).

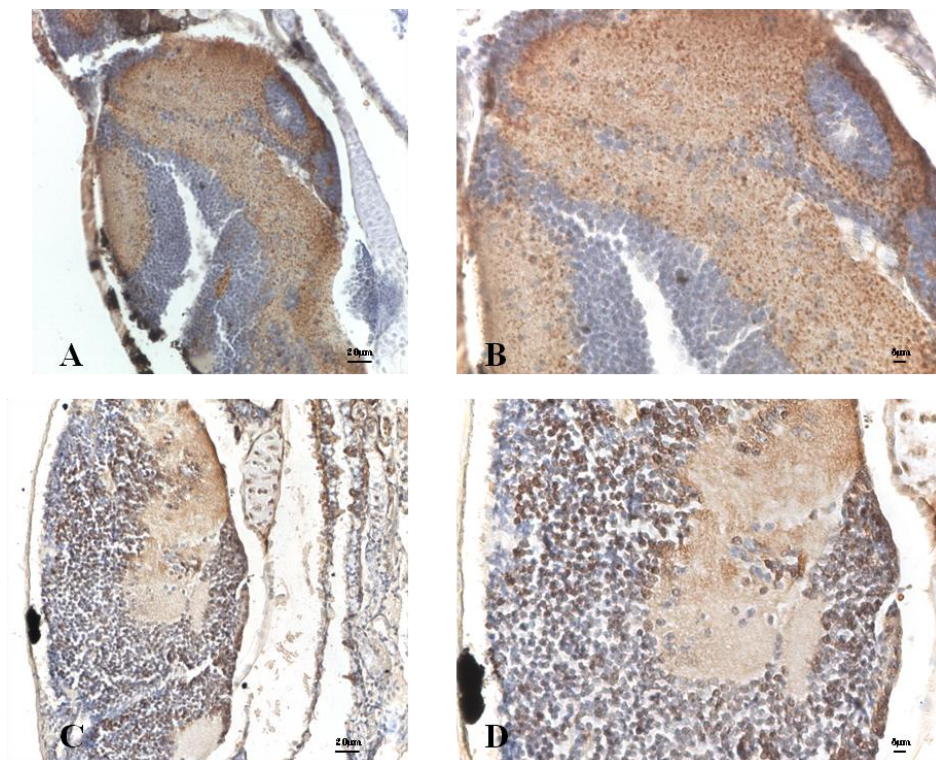


Figura 24. Immagini: Sezioni seriali di larve di 5 giorni di *Danio rerio*, rivelazione anti-NGF, anti-BDNF. **A-B:** encefalo della larva di 5 giorni immunoreattivo all'anticorpo antiBDNF; **C-D:** encefalo della larva di 5 giorni immunoreattivo all'anticorpo anti-NGF.

Per quanto riguarda il BDNF è stato possibile osservare una notevole reattività nell'encefalo degli individui di controllo a carico del telencefalo, cervelletto e midollo allungato (Fig.25, A-F). La reattività all'anticorpo risulta ascrivibile a prolungamenti cellulari a carico delle diverse aree cerebrali sopra elencate, a carico di cellule in

posizione perinucleare come le cellule e le fibre del subpallio dorsale e del pallio (Fig.25 A e B), le cellule cerebellari del Purkinje (Fig.25 C e D) e le cellule con abbondante citoplasma del midollo allungato (Fig.25 E ed F).

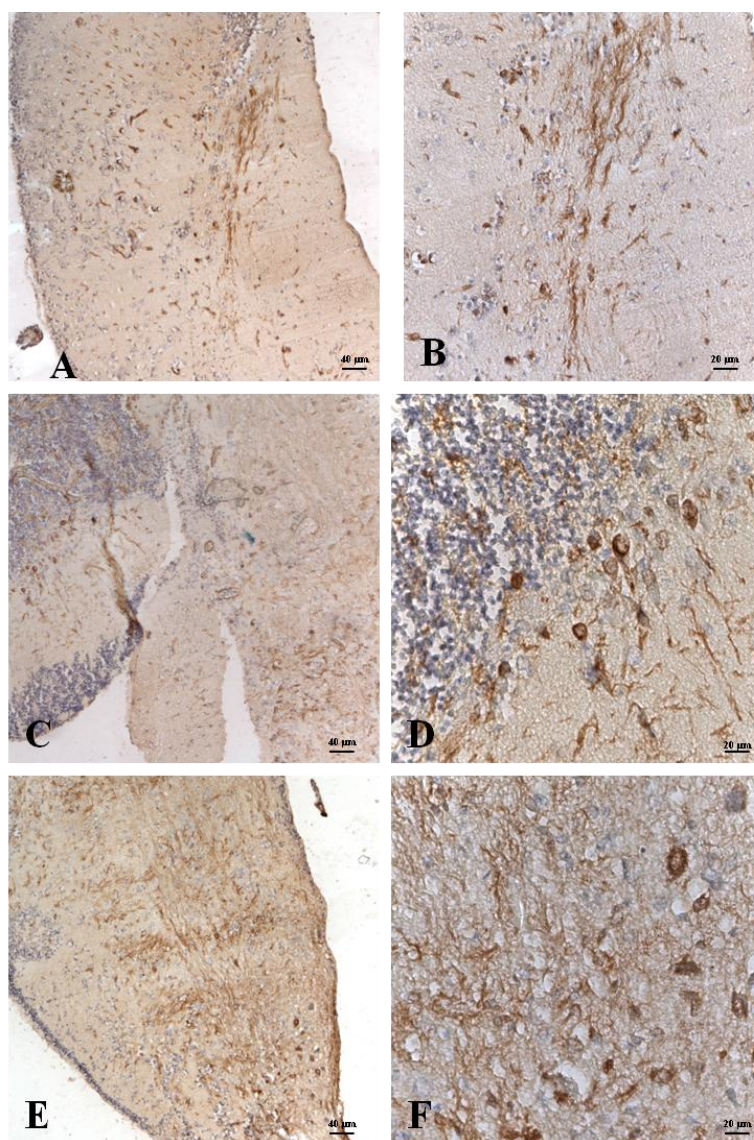


Figura 25. Immagini: Sezioni Sagittali, encefalo di *Danio rerio*. Controlli Rilevazione Anti-BDNF. **A-B:** immunoreattività marcata presente nel telencefalo dorsale e ventrale; **C-D:** marcata positività a carico di cellule, prolungamenti e fibre, nella zona del cervelletto; **E-F:** positività marcata a carico del midollo allungato.

La reattività all'anticorpo anti-BDNF risulta diminuita già dopo 2 giorni dall'inizio del trattamento, e rimasta tale dopo 7, in tutte le zone risultate positive nell'encefalo dei

controlli (Fig.26, A, C, E). Dopo 16 giorni si è potuto osservare un notevole decremento del segnale in tutto l'encefalo. Molto ridotte, quasi assenti, le positività osservate a carico delle cellule e dei prolungamenti, così come nel parenchima cerebrale osserviamo una considerevole riduzione delle fibre immunomarcate (Fig. 26, B, D, F).

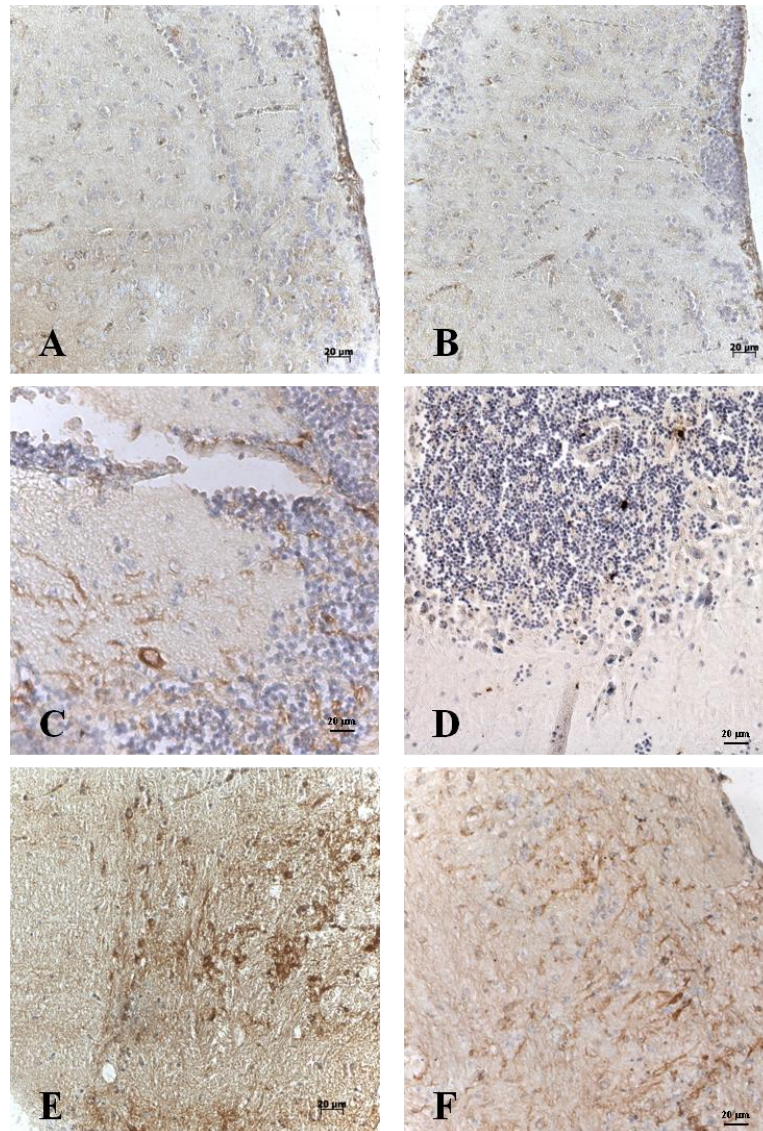


Figura 26. Immagini: Sezioni Sagittali, encefalo di *Danio rerio*, 2 e 16gg. Rilevazione Anti-BDNF. **A-C-E:** diminuzione della immunoreattività a carico di cellule del telencefalo dorsale e ventrale, cervelletto e midollo allungato nell'encefalo dei pesci trattati per 2 e 7 giorni; **B-D-F:** riduzione marcata della reattività nel telencefalo, cervelletto e midollo allungato nei pesci esposti per 16 giorni.

6.5 Analisi dell'integrità della BEE

I risultati ottenuti riguardano esemplari adulti di *Danio rerio* esposti al cadmio per 16 giorni e poi sottoposti ad iniezione con una soluzione di perossidasi di rafano; esemplari adulti di *Danio rerio* non esposti al cadmio e sottoposti ad iniezione con soluzione di perossidasi di rafano; esemplari adulti di *Danio rerio* non esposti al cadmio e sottoposti ad iniezione con soluzione di PBS. Come possiamo evincere dalle immagini, negli esemplari esposti al cadmio per 16 giorni (Fig.27, A e B), esso è riuscito ad alterare la permeabilità della BEE poiché possiamo notare presenza di segnale intensamente colorato all'interno del parenchima cerebrale proveniente dalla superficie meningea dell'encefalo dove è presente vascolarizzazione; al contrario negli esemplari non esposti al cadmio (Fig. 27, C) notiamo la presenza di segnale limitato solo alla vascolatura, indice di una BEE intatta che presenta una preservata capacità di fungere da barriera selettiva. Infine, l'ultima immagine (Fig.27, D) mostra che il segnale non è aspecifico e/o dovuto alle rivelazioni delle perossidasi endogene e conferma che l'alterazione della BEE non è dovuta alla modalità di iniezione della perossidasi, dal momento che non troviamo tracce all'interno dei tessuti cerebrali, incluso i vasi sanguigni.

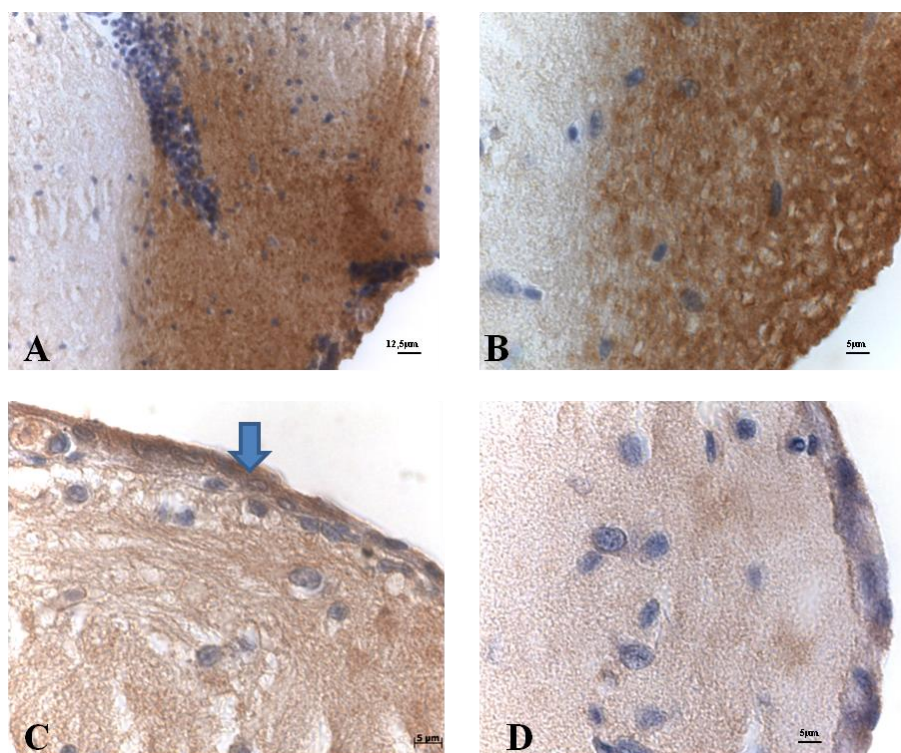


Figura 27. Immagini: Sezioni sagittali di *Danio rerio* esposti alla diaminobenzidina; **A-B:** Sezione di encefalo di *Danio rerio* trattato 16 giorni con CdCl_2 e poi sottoposto ad iniezione con soluzione di perossidasi di rafano.; **C:** Sezione di encefalo di *Danio rerio* non trattato con CdCl_2 e poi sottoposto ad iniezione con soluzione di perossidasi di rafano; **D:** Sezione di encefalo di *Danio rerio* non trattato con CdCl_2 e sottoposto ad iniezione con soluzione di PBS.

6.6 Analisi dei livelli degli mRNA dei geni *plp1*, *mpz*, *mbp*

L'osservazione del bandeggio della corsa elettroforetica mostra un amplificato maggiore per il gene *mpz* negli encefali sottoposti a trattamento con il Cd rispetto al controllo in cui il segnale è meno evidente, mentre *plp1* e *mbp* mostrano un segnale piuttosto costante tra il controllo e trattati. Il controllo negativo non presenta bande, il che è indice che l'amplificazione ottenuta nei campioni di nostro interesse non è il risultato di una contaminazione presente nei reagenti usati. Mediante analisi

densitometrica (Fig.28, B), si osserva che il livello di espressione di mpz risulta significativamente raddoppiato rispetto al controllo, in seguito a normalizzazione dei segnali con quello derivante dalla coppia di primers specifici per la β -actina, già dopo 2 giorni di trattamento, mentre dopo 7 e 16 i livelli di accumulo risultano essere di circa 2,5 volte superiori rispetto a quelli del controllo. Per quanto riguarda plp1 e mbp non sono state osservate significative discrepanze nei livelli di espressione tra il controllo e i trattati.

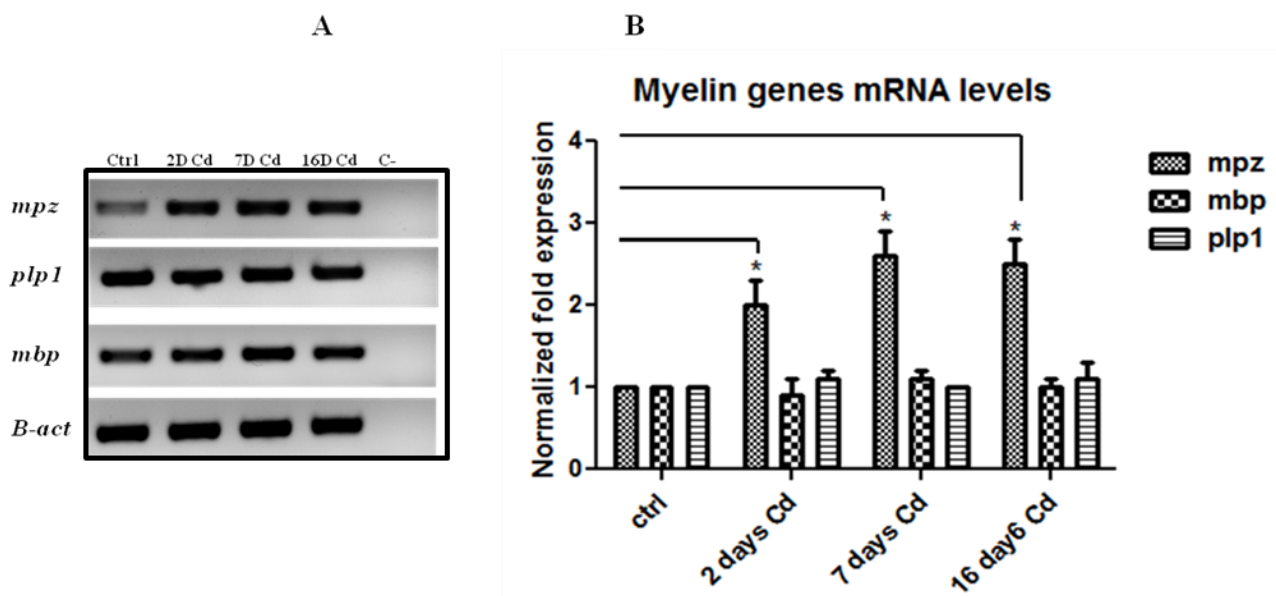


Figura 28: Rt-PCR semiquantitativa. **A:** Bandeggio derivante da reazioni di amplificazione dei campioni con specifici primers in seguito rivelati su gel di agarosio mediante UV (per C- la reazione è stata allestita senza cDNA). La β -actina è stata usata come normalizzatore **B:** Istogramma dei rapporti dei livelli di accumulo degli mRNA di mpz, plp1, mbp presenti negli estratti di RNA totale degli encefali dei pesci esposti per 2,7, 16 giorni al CdCl_2 relativi al controllo. La normalizzazione è stata effettuata mediante il segnale derivante dall'amplicone della β -actina. Livello di significatività impostato p value =0,05;*p<0,05.

Capitolo 7

Discussione e Conclusioni

I risultati ottenuti confermano gli effetti tossici esercitati dal Cd (alla concentrazione di 1mg/L, ritrovata nell'ambiente) considerando la presenza di una correlazione esistente tra la quantità crescente di cadmio che si accumula nell'encefalo del pesce (Favorito et al., 2011) e la severità delle alterazioni riscontrate. Gli esperimenti di western blotting e di immunoistochimica mostrano che l'esposizione al Cd esplica la sua azione tossica sia sulle cellule della neuroglia che sulle cellule nervose, come evidenziato dall'utilizzo degli anticorpi anti-GFAP, anti-A β , anti-GLUD1 e anti-BDNF. E' stato interessante notare che per quanto riguarda i marcatori presi in considerazione c'è stata una diversa entità delle alterazioni riportate nelle diverse aree dell'encefalo, probabilmente a causa di una diversa composizione cellulare e quindi differente capacità di rispondere agli insulti. Maggiormente colpite risultano sicuramente le zone del cervelletto e del telencefalo, sia il pallio che il subpallio. Tra le cellule della neuroglia danneggiate abbiamo anche gli oligodendrociti, considerando l'alterazione dell'integrità della mielina osservata mediante colorazione con Methasol Fast Blue e dell'espressione del gene mpz, che come riportato in un lavoro (Bai et al., 2014) sembra giocare un ruolo in seguito a danno nervoso. L'immunoistochimica effettuata con l'anticorpo anti-IL1 β ha messo in luce l'induzione di un processo pro-infiammatorio mediato dal CdCl₂, processo caratteristico di diverse patologie neurodegenerative come il morbo di Parkinson e la patologia di Alzheimer. Allo stesso modo, si è riscontrato l'incremento dei livelli del peptide β -amiloide. Le placche amiloidi costituite sostanzialmente da fibrille del peptide amiloide sono la principale caratteristica istopatologica della

malattia di Alzheimer. Secondo l'ipotesi della cascata amiloide rappresentano la principale causa della neurodegenerazione presente nei malati di Alzheimer (Pimplikar, 2009). L'ipotesi prevede che l'aumento dell'accumulo degli oligomeri del peptide amiloide, così come la formazione di fibre e placche, strutture di ordine gerarchico superiore, determina una attivazione delle cellule della microglia con conseguente produzione di citochine e fattori del complemento, processo autoamplificativo che determina progressivi danni sinaptici e neuritici. La conseguente alterazione dell'omeostasi ionica delle cellule nervose determina un'alterazione dell'attività di chinasi e fosfatasi, evento che determina l'iperfosforilazione della proteina associata ai microtubuli tau con conseguente formazione dei grovigli neurofibrillari, principali protagonisti nell'innescare la neuro degenerazione (Pimplikar, 2009). Un altro dato che risulta spesso associato a disfunzione sinaptica ed iper-eccitazione è l'aumento dell'espressione della glutammato deidrogenasi, risultato osservato mediante western blotting su estratti proteici totali di encefali di pesci esposti a cloruro di cadmio. Gli esperimenti di immunoistochimica hanno mostrato un aumento dell'intensità del segnale sia a livello di cellule nervose GABAergiche che glutamatergiche, a livello dello strato delle cellule del Purkinje del cervelletto, del diencefalo e del telencefalo. Difetti nella neurotrasmissione GABAergica e glutamatergica sono causa di diverse patologie a carico del SNC (Mori and Mishina, 1995). In aggiunta, a causa dell'ipotesi che l'eccessiva stimolazione dei recettori ionotropici del glutammato è in parte responsabile della patologia di Alzheimer, è importante notare che la distruzione o l'alterazione della neurotrasmissione mediata dal GABA potrebbe inficiare in modo

significativo la relazione funzionale esistente tra il sistema inibitore ed eccitatore. Infatti il bilancio tra i neurotrasmettitori eccitatori ed inibitori è coinvolto in diversi eventi nel SNC, bilancio che qualora venisse alterato porterebbe all'innescio di fenomeni neurodegenerativi (Almazan et al., 2000). E' da notare comunque la scarsa presenza del segnale del peptide β -amiloide nel parenchima extracellulare, luogo in cui in modelli per la patologia di Alzheimer, così come nei malati della suddetta malattia, vengono rilevate le placche senili, uno dei principali marcatori istomorfologici, nonché marcatore diagnostico, della AD. L'incremento dei livelli del peptide β -amiloide sembra essere quindi da ascrivere sostanzialmente a un incremento intracellulare, che rappresenta uno dei fenomeni caratteristici di stadi precoci della patologia, in cui cominciano a manifestarsi i primi sintomi connessi al danneggiamento di alcune capacità cognitive. L'incremento dei livelli del peptide amiloide osservato potrebbe comunque anche essere in parte connesso ad un aumento della presenza di oligomeri a livello extracellulare, fenomeno che potrebbe essere alla base di uno squilibrio nella funzionalità sinaptica e nei livelli di rilascio di neurotrasmettitori, alterazione correlabile con l'aumento osservato dei livelli della glutammato deidrogenasi e della piruvato carbossilasi. A conferma di quanto ottenuto c'è anche la positività riscontrata dopo 16 giorni di esposizione al Fluorojade C, dato che attesterebbe la presenza di neuro degenerazione, in particolare nelle zone che sono risultate maggiormente alterate considerando i parametri presi in considerazione. Interessante è l'osservazione della riduzione della GFAP e del BDNF. La GFAP in quanto marcatore delle cellule astrogliali, mette in evidenza nell'encefalo del pesce sostanzialmente le cellule della

glia radiale, tipo cellulare maggiormente presente in *Danio rerio*. Come è noto (Kroehne et al., 2011) queste cellule hanno carattere staminale, non solo per la generazione delle cellule gliali ma anche per le cellule nervose, infatti proprio per questo l'encefalo di *Danio rerio* così come quello di altri teleostei presenta un elevato grado di generazione nervosa, caratteristica probabilmente connessa alle esigenze cognitive, motorie e sensoriali del pesce. La riduzione della GFAP e del fattore neurotrofico BDNF, che ha mostrato una marcata espressione nei controlli soprattutto nelle aree proliferative dell'encefalo del pesce, espressione ridotta con il trattamento, potrebbe quindi attestare un danno arrecato dal cadmio al meccanismo di neurogenesi, fenomeno che potrebbe rafforzare il danno esercitato, a causa della mancanza di sostituzione funzionale dei centri nervosi in primis danneggiati. Anche la barriera emato-encefalica inoltre risulta essere danneggiata dopo 16 giorni, tempo sufficiente, con la concentrazione usata, a determinare danni a carico della preziosa omeostasi cerebro-vascolare salvaguardata da questa barriera. Questo studio conferma inoltre la capacità del Cd alla concentrazione di 9µM di arrecare danni ai meccanismi di sviluppo e in particolar modo del sistema nervoso centrale, determinando letalità, alterazioni fenotipiche ed aumento dei fenomeni apoptotici negli embrioni trattati.

BIBLIOGRAFIA

- **Adamo S, Carinci P, Stefanini M. (2002).** Istologia di V. Monesi. Quinta edizione. Ed Piccinin. pag. 640; 689-695.
- **Adolf B, Chapouton P, Lam CS, Topp S, Tannhäuser B, Strähle U, Götz M, Bally-Cuif L. (2006).** Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Dev. Biol* 295:278-293.
- **Almazan G, Liu HN, Khorchid A, Sundararajan S, Martinez-Bermudez AK, Chemtob S. (2000).** Exposure of developing oligodendrocytes to cadmium causes HSP72 induction, free radical generation, reduction in glutathione levels, and cell death. *Free Radic Biol Med* 29(9): 858-869.
- **Alsop D, Matsumoto J, Browns S, Van Der Kraakg. (2008).** Retinoid requirements in the reproduction of zebrafish. *Gen. Com Endocrinol* 156(1): 51-62.
- **Anderson MJ, Swanson KA, Waxman SG, Eng LF. (1984).** Glial fibrillary acidic protein in regenerating teleost spinal cord. *J Histochem Cytochem* 32: 1099-1106.
- **Antanitus DS, Choi BH, Lapham LW. (1976).** The demonstration of glial fibrillary acidic protein in the cerebrum of the human fetus by indirect immunofluorescence. *Brain Res* 103:613–616.
- **Antonio MT, Corpas I, Leret ML. (1999).** Neurochemical changes in newborn rats brain after gestational cadmium and lead exposure. *Toxicol. Lett.* 104:1-9.
- **Asmuss M, Mullenders LH, Eker A, Hartwig A. (2000).** Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Toxicol Lett.* 2000 Mar 15;112-113:227-31.
- **Bai Q, Parris RS, Burton EA. 2014.** Different mechanisms regulate expression of zebrafish myelin protein zero (P0) in myelinating oligodendrocytes and its induction following axonal injury. *J Biol Chem.* 289(35): 24114-28.

- **Bass AH and Grober MS. (2001).** Social and neural modulation of sexual plasticity in teleost fish. *Brain Behav. Evol.* 57 293-300.
- **Begni B, Brighina L, Sirtori E, Fumagalli L, Andreoni S, Beretta S, Oster T, Malaplate C, Isella V, Apollonio I, Ferrarese C. (2004).** Oxidative stress impairs glutamate uptake in fibroblasts from patients with Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 2004 Sep 15;37(6):892-901.
- **Berman J R, Skariah G, Maro GS, Mignot E, Murrain P. (2009).** Characterization of two melanin-concentrating hormone genes in zebrafish reveals evolutionary and physiological links with the mammalian MCH system. *J.Comp. Neurol* 517 , 695-710.
- **Bernardos R and Raymond P. (2006).** GFAP transgenic zebrafish. *Gene Expr Patterns.* 2006 Oct;6(8):1007-13. Epub 2006 Jun 9.
- **Bondier JR, Michel G, Propper A, Badot PM. (2008).** Harmful effects of cadmium on olfactory system in mice. *Inhal Toxicol.* 2008 Oct;20(13):1169-77.
- **Bresch H, Beck H, Ehlermann D, Schlaszus H, Urbanek M. (1990).** A long-term toxicity test comprising reproduction and growth of zebrafish with 4-chloroaniline. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1990 May-Jun;19(3):419-27.
- **Bullini L, Pignatti S, Virzo De Santo A. (UTET, 2002).** *Ecologia generale* (cap.15).
- **Cardone B, Roots BI. (1990).** Comparative immunohistochemical study of glial filament proteins (glial fibrillary acidic protein and vimentin) in goldfish, octopus and snail. *Glia* 3, pp. 180-192.
- **Carmignoto G. (2000).** Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. *Prog Neurobiol.* Dec;62(6):561-81.
- **Casalicchio G. (2000).** Il sistema suolo. In *I microelementi nell'ecosistema terrestre* (vol.1) a cura di Casalicchio G. Pitagora Editrice, Bologna: 232- 265.
- **Casalino E, Calzaretti G, Sblano C, Landriscina C. (2002).** Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium *Toxicology*, 1-2, 37-50.

- **Cattani O, Serra R, Isani G, Raggi G, Cortesi P, Carpena E. (1996).** Correlation between metallothionein and energy metabolism in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, *Biochem. Physiol.* 113C, 193–199.
- **Choi IY, Lee P, Wang WT, Hui D, Wang X, Brooks WM, Michaelis EK. (2014).** Metabolism Changes During Aging in the Hippocampus and Striatum of Glut1 (Glutamate Dehydrogenase 1) Transgenic Mice. *Neurochem Res.* 2014;39(3):446-55. doi: 10.1007/s11064-014-1239-9. Epub 2014 Jan 21.
- **Cousins RJ. (1985).** Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.*, 65: 238-309.
- **Cuoghi B, Mola L. (2009).** Macroglial cells of the teleost central nervous system: a survey of the main types. *Cell Tissue Res.* 2009 Dec;338(3):319-32. doi: 10.1007/s00441-009-0870-2. Epub 2009 Oct 29.
- **Czarnecki LA, Moberly AH, Rubinstein T, Turkel DJ, Pottackal J, McGann JP. (2011).** In vivo visualization of olfactory pathophysiology induced by intranasal cadmium instillation in mice. *Neurotoxicology.* 2011 Aug; 32 (4): 441-9.
- **Dabrowski KR, Gereszgo A. (2001).** Ascorbic acid and reproduction in fish endocrine regulation and gamete quality. *Acquacult Res* 32: 623-638.
- **Dahl D. (1982).** Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Schwann cells: fact or artifact? *J. Histochem. Cytochem.* 30: 912-918.
- **Dahl D, Bignami A. (1985).** Intermediate filaments in nervous tissue. In: Shay JW, editor. *Cell and muscle motility*, vol. 6. New York: Plenum Press. p 75–96.
- **Danbolt NC. (2001).** Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- **Dave G, Andersson K, Berglind R, Hasselrot B. (1981).** Toxicity of eight solvent extraction chemicals and of cadmium to water fleas, *Daphnia magna*, rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Comp Biochem Physiol C.* 1981; 69C(1): 83-98.
- **Dos Santos P, Gehlen G, Faccioni-Heuser MC, Zancan D, Achaval M. (2002).** Distribution of glial cells in the central nervous system of the pulmonate snail

Megalobulimus oblongus identified by means of a glial fibrillary acidic protein marker. *Acta Zoologica* Volume 83 issue 4: 345-351.

- **Eaton R, Farley RD. (1974).** Spawning cycle and egg production in zebrafish, *Brachidanio rerio*, reared in the laboratory. *Copeia* (1): 195-204.
- **Engeszer RE, Patterson LB, Roa AA, Parichy DM. (2007).** Zebrafish in the wild: areview of natural history and new notes from the field *Zebrafish* 4(1): 21-40.
- **Elmqvist JK, Swanson JJ, Sakaguchi DS, Ross LR, Jacobson CD. (1994).** Development distribution of GFAP and vimentin in the Brazilian opossum brain. *Journal of Comparative Neurology* 344:283-296.
- **Esquifino AI, Márquez N, Alvarez-Demanuel E, Lafuente A. (1999).** Effects of chronic alternating cadmium exposure on the episodic secretion of prolactin in male rats. *J Trace Elem Med Biol.* **1999** Apr;12(4): 205-10.

Favorito R, Chiarelli G, Grimaldi MC, De Bonis S, Lancieri M, Ferrandino I. (2011). Bioaccumulation of cadmium and its cytotoxic effect on zebrafish brain. *Chemistry and Ecology* Volume 27, Supplement 2.

- **Fern R, Black JA, Ransom BR, Waxman SG. (1996).** Cd(2+)-induced injury in CNS white matter. *J Neurophysiol.* **1996** Nov;76(5): 3264-73.
- **Gabbiani G, Baic D, Déziel C. (1967).** Toxicity of cadmium for the central nervous system. *Exp Neurol.* Jun;18(2): 154-60.
- **Geldmacher-Voss B, Reugles AM, Pauls S, and Campos-Ortega JA. (2003).** A-90 degree rotation of the mitotic spindle changes the orientation of mitoses of zebrafish neuroepithelial cells. *Development* 130, 3767-3780.
- **Gerlach G. (2006).** Pheromonal regulation of reproductive success in female zebraish: female suppression and male enhancement. *Anim Behav* 72: 1119-114.
- **Gilland E, Baker R. (1993).** Conservation of neuroepithelial and mesodermal segments in the embryonic vertebrate head. *Acta Anat* 148:110–123.
- **Grupp L, Wolburg H, Mac AF. (2010).** Astroglial Structures in the Zebrafish Brain. *J Comp Neurol.* 2010 Nov 1;518(21):4277-87. doi: 10.1002/cne.22481.

- **Gupta A, Gupta A, Murthy RC, Chandra SV. (1993).** Neurochemical changes in developing rat brain after pre- and postnatal cadmium exposure. *Bull Environ Contam Toxicol.* **1993** Jul; 51(1):12-7.
- **Gupta A, Gupta A, Shukla GS. (1995).** Development of brain free radical scavenging system and lipid peroxidation under the influence of gestational and lactational cadmium exposure. *Hum Exp Toxicol.* **1995** May;14(5):428-33.
- **Hart RP, Rose CS, Hamer RM. (1989).** Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 11, 933–943.
- **Hassoun EA, Stohs SJ. (1996).** Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A.1 cell cultures. *Toxicology.* 1996 Sep 2;112(3):219-26.
- **Jackman WR, Langeland JA, Kimmel CB. (2000).** Islet reveals segmentation in the *Amphioxus* hindbrain homolog. *Dev Biol* 220:16–26.
- **Jia S, Wu D, Xing C, and Meng A. (2009).** Smad 2/3 activities are required for induction and patterning of the neuroectoderm in zebrafish. *Dev. Biol.* 333, 273-284.
- **Jessen KR. (2004)** Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 36(10):1861-7.
- **Johnson AD and Sigman MB. (1971).** "Early actions of cadmium in the rat and domestic fowl testis. IV. Autoradiographic location of ¹¹⁵cadmium" in *J.Reprod. Fertil.*; 24:115.
- **Kàlmàn M. (1998).** Astroglial architecture of the carp (*Cyprinus carpio*) brain as revealed by immunohistochemical staining against glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Anat Embryol* 198:409–433.
- **Kàlmàn M, Ari CS. (2002).** Distribution of GFAP immunoreactive structures in the rhombencephalon of the sterlet (*Acipenser ruthenus*) and its evolutionary implication *J Exp Zool* 293, pp. 395-406.
- **Kari G, Rodeck U, Dicker AP . (2007).** Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Jul;82(1):70-80. Epub 2007 May 9. Review.

- **Kaslin J, Ganz J, Brand M. (2008).** Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non mammalian vertebrate brain. *Biol. Sci* 363:101-122.
- **Kawai H, Arata N, Nakayasu H. (2001).** Three-dimensional distribution of astrocytes in zebrafish spinal cord. *Glia*. **2001** Dec;36(3):406-13.
- **Kettenmann H, Ransom BR. (1995).** Neuroglia. Oxford University Press, New York.
- **Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ulmann B, Schilling TF. (1995).** Stages of embryonic zebrafish. *Developmental dynamics* 203:253-310.
- **Korpela H, Loueniva R, Yrjänheikki E, Kauppila A. (1986).** Lead and cadmium concentrations in maternal and umbilical cord blood, amniotic fluid, placenta, and amniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol*. **1986** Nov;155(5):1086-9.
- **Kroehne V, Freudenreich D, Hans S, Kaslin J and Brand M. 2011.** Regeneration of adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-like progenitors. *Development* 138: 4831-41.
- **Lafuente A, Esquifino AI. (1999).** Cadmium effects on hypothalamic activity and pituitary hormone secretion in the male. *Toxicol Lett*. **1999** Nov 22;110(3):209-18. Review.
- **Lafuente A, Márquez N, Piquero S, Esquifino AI. (1999).** Cadmium affects the episodic luteinizing hormone secretion in male rats: possible age-dependent effects. *Toxicol Lett*. **1999** Jan 11;104(1-2):27-33.
- **Laming PR, Kimelberg H, Robinson S, Salm A, Hawrylak N, Müller C, Roots B. (2000).** Neuroglia phylogeny and ontogeny. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* Volume 24, Issue 3: 295-340.
- **Levine E. (1989).** Organization of astrocytes in visual pathways of the goldfish: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 285: 231-245.
- **Levitt P, Rakic P. (1980).** Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* 193: 815-840.

- **Liem K, Bemis W, Walker W, Grande L. (EdiSES, 2002).** Anatomia comparata dei vertebrati (cap. 7).
- **Lindenau J, Noack H, Possel H, Asayama K, Wolf G. (2000).** Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. *Glia* 29: (1) 25-34.
- **Lino M, Goto K, Kakegawa W, Okado H, Sudo M, Ishiuchi S, Miwa A, Takayasu Y, Saito I. (2001).** Glia-synapse interaction through Ca^{2+} permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science* 292: 926-929.
- **Liu J, Kadiiska MB, Corton JC, Qu W, Waalkes MP, Mason RP, Liu Y, Klaassen CD. (2002).** Acute cadmium exposure induces stress-related gene expression in wild-type and metallothionein-I/II null mice. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 525–535.
- **Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M. (2000).** Isolation of radial glial cells by fluorescent activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127: 5253-5263.
- **Marcus RC, Easter SS. (1995).** Expression of glial fibrillary acidic protein and its relation to tract formation in embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp. Neurol* 359: 365-381.
- **Mehus AA, Muhonen WW, Garrett SH, Somji S, Sens DA, Shabb JB. (2014).** Quantitation of Human Metallothionein Isoforms: A Family of Small, Highly Conserved, Cysteine-rich Proteins. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Apr;13(4):1020-33. doi: 10.1074/mcp.M113.033373. Epub 2014 Feb 3.
- **Méndez-Armenta M, Ríos C. (2007).** Cadmium neurotoxicity. *Environ Toxicol Pharmacol.* May;23(3):350-8. doi: 10.1016/j.etap.2006.11.009. Epub 2006 Nov 28.
- **Mirsky R, Jessen KR, Brennan A, Dean CH, Zhang AL, Cass DT. (2000).** Endothelins control the timing of Schwann cell generation in vitro and in vivo. *Dev. Biol.* 227, 545–557.
- **Moence CB, Prince EV. (2002).** Constructing the Hindbrain: Insights From the Zebrafish. *Dev Dyn.* 2002 May;224(1):1-17. Review.
- **Monzón-Mayor M, Yanes-Méndez C, De Barry J, Capdevilla-Carbonell C, Renau-Piqueras J, Tholey G, Gombos G. (1998).** Heterogeneous immunoreactivity

of glial cells in the mesencephalon of a lizard: A double labelling immunohistochemical study. *J Morphol* 235 (2):109 –119.

- **Mori H, Mishina M. (1995).** *Structure and function of NMDA receptor channel.* *Neuropharmacology* 1995; 34: 1219-1237.
- **Mueller T, Vernier P, Wullimann M. (2004).** The adult central nervous cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio*. *Brain Res.* 1011, 156-169.
- **Nasiadka A, Clark MD. (2012).** Zebrafish breeding in the laboratory environment. *ILAR J.*;53(2):161-8. doi: 10.1093/ilar.53.2.161. Review.
- **Nielsen AL and Jørgensen AL. (2003).** Structural and functional characterization of the zebrafish gene for glial fibrillary acidic protein, GFAP. *Gene.* 2003 May 22;310:123-32.
- **Nordberg GF, Kjellstrom T, Nordberg M. (1985).** “Kinetics and metabolism” In: *Cadmium and health, Vol. I, Exposure, dose and metabolism*, Friberg L, Elinder CG, Kjellstrom T e Nordberg GF. Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, p.103.
- **Notarache G, Arnesano F, Calò V, Meleleo D. (2014).** Heavy metals toxicity: effect of cadmium ions on amyloid beta protein 1-42. Possible implications for Alzheimer's disease. *Biometals.* Apr;27(2):371-88. doi: 10.1007/s10534-014-9719-6. Epub 2014 Feb 21.
- **Obel LF, Muller MS, Walls AB, Sickmann HM, Balk LK, Waagepetersen HS, et al (2012).** Brain glycogen-new perspectives on its metabolic function and regulation at the subcellular level. *Front Neuroenergetics.* 2012 Mar 2;4:3. doi: 10.3389/fnene.2012.00003. eCollection 2012.
- **Onteniente B, Kimura H, Maeda T. (1983).** Comparative study of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates by PAP immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 215(4):427–436.
- **Padoa E. (Feltrinelli, 2002).** *Manuale di anatomia comparata dei vertebrati* (pp. 360-367).

- **Parmenteir C, Taxi J, Balment R, Nicolas G, Cala A. (2006).** Caudal neurosecretory system of the zebrafish: Ultrastructural organization and immunocytochemical detection of urotensins. *Cell. Tissue Res.* 325, 111-124.
- **Penkowa M, Nielsen H, Hidalgo J, Bernth N, Moos T. (1999).** Distribution of metallothionein I+II and vesicular zinc in the developing central nervous system: correlative study in the rat. *J Comp Neurol* 412(2):303-18.
- **Pimplikar SW. (2009).** Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 41(6): 1261-8.
- **Pradel G, Schmidt R, Schachner M. (2000).** Involvement of L1.1 in Memory Consolidation after Active Avoidance Conditioning in Zebrafish. *Journal of Neurobiology.* Volume 43, Issue 4, pages 389–403.
- **Pritchard VL, Lawrence J, Butlin RK, Krause J. (2001).** Shoal choice in zebrafish, *Danio rerio*: the influence of shoal size and activity. *Anim Behav* 62: 1085-1088.
- **Privat A, Gimenez-Ribotta A, Ridet JL. (1995).** Morphology of Astrocytes. In: Kettenmann H, Ransom BR, editors. *Neuroglia.* New York,Oxford: Oxford University Press, 1995:3-22.
- **Ransom B, Behar T, Nedergaard M. (2003).** New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci* 26:520–522.
- **Rink E and Wullmann M. (2002).** Connection of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost., *Brain Res., Bull.* 57, 385-387.
- **Robbins. (1999).** Le basi patologiche delle malattie. Volume I. VI Edizione Piccin a cura di Contrar, Kumar, Collins. W.B. Saunders Company Philadelphia-Pennsylvania-USA; pp. 492.

- **Sadiq M and Dekker M. (1992).** “Cadmium in marine environment”,In: Toxic Chemistry in Marine Environments (pp. 107-153).
- **Santoriello C and Zon L. (2012).** Modeling human disease in zebrafish. J Clin Invest. **2012** Jul;122(7):2337-43. doi: 10.1172/JCI60434. Epub **2012** Jul 2.
- **Schilling TF, Kimmel CB. (1994).** Segment and cell type lineage restrictions during pharyngeal arch development in the zebrafish embryo. *Development* 120:483–494.
- **Schousboe A, Waagepetersen HS. (2008).** GABA neurotransmission an overview. Pp. 213-226.
- **Seeley, Stephens, Tate. (Idelson-Gnocchi, 2005) Anatomia** (pp.247-249; pp.298-308).
- **Selman K., Wallace RA., Sarka A., Qi X. (2005).** Stages of oocyte development in the zebrafish *Brachidanio Rerio*. *J. Morphol* 218(2): 203-224.
- **Sheperd GM. (1994).** Neurobiology, 3rd Edition (Oxford University Press).
- **Silver J, Miller JH. (2004).** Regeneration beyond the glial scar. *NATURE*. 5:146-156.
- **Solnica-Krezel L, Driever W. (1994).** Microtubule arrays of the zebrafish yolk cell: organization and function during epiboly. *Development*. 1994 Sep;120(9):2443-55.
- **Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. (2008).** The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc*. **2008** Feb;83(1):13-34. Epub 2007 Dec 17. Review.
- **Stohs SJ, Bagchi D. (1995).** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*. **1995** Feb;18(2):321-36. Review.
- **Stoeppler M. (1991).** "Cadmium". In: Merian E. Ed., metals and their compounds in the environment. VCH, New York, p.803.
- **Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Slotwinska M, Kaminska T, Sniezko R, Abramczyk D, Filar J, Paduch R, Kandefer-Szerszen M. (2000).** The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology* 145(2):159-71.

- **Takey Y, and Loretz C A. (2006.) Endocrinology.** In: The physiology of fishes pp. 271-318.
- **Talwar PK, Jhingran AG. (1991).** Inland fishes of India and adjacent countries. A.A. Balkema, Rotterdam, 1158pp.
- **Tjälve H, Henriksson J, Tallkvist J, Larsson BS, Lindquist NG. (1996).** Uptake of manganese and cadmium from the nasal mucosa into the central nervous system via olfactory pathways in rats. *Pharmacol Toxicol.* 1996 Dec;79(6):347-56.
- **Tiffany-Castiglioni E, Qian Y. (2001).** Astroglia as metal depots: molecular mechanisms for metal accumulation, storage and release. *Neurotoxicology.* 22(5):577-92.
- **Tomasiewicz HG, Flaherty DB, Soria JP, Wood JG. (2002).** Transgenic zebrafish model of neurodegeneration.
- **Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA.(2001).** Control of synapse number by glia. *Science* 291: 657-660.
- **Vernier P and Wullimann M. (2009).** Evolution of the posterior tuberculum and preglomerular nuclear complex. In: *Springer Encyclopedia of neuroscience, part.5* pp. 1318-1326.
- **Voigt T. (1989).** Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J. comp. Neurol.* 289: 74-88.
- **Waalkes MP. (2003).** Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res.* 2003 Dec 10;533(1-2):107-20. Review.
- **Waisberg M, Joseph P, Beverley H, Detmar B. (2003)** Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis (*Toxicology* 192 95-117).
- **Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KMK. (2004).** Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Rad Biol Med*;36(11):1434-43.

- **Wang B, Du J. (2013).** Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:898034. doi: 10.1155/2013/898034. Epub 2013 Aug 12. Review
- **Westerfield M. (1995).** The Zebrafish Book. Eugene: University of Oregon Press.
- **Wullimann M, Mueller T. (2004).** Teleostean and mammalian forebrains contrasted evidence from genes to behavior. *J. Comp. Neurol.* 475, 143-162.
- **Wong KL, Klaassen CD. (1982).** Neurotoxic effects of cadmium in young rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1982 May;63(3):330-7.
- **Xi Y, Noble S, Ekker M. (2011)** Modeling Neurodegeneration in Zebrafish. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011 Jun;11(3):274-82. doi: 10.1007/s11910-011-0182-2. Review.
- **Yu AC, Drejer J, Hertz L, Schousboe A. (1983).** Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons. *J. Neurochem* 41:1484-1487
- **Zaganas I, Kanavouras K, Mastorodemos V, Latsoudis H, Spanaki C, Plaitakis A. (2009).** The human GLUD2 glutamate dehydrogenase localization and functional aspects.